Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GEWINNUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON LYMPHOKINEN AUS LYMPHOZYTENKULTUREN DES HUHNES

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Weiler
Tierarzt aus Duisburg

Berlin 1985
Journal Nr.
1238

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GEWINNUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON LYMPHOKINEN AUS LYMPHOZYTEN-KULTUREN DES HUHNES

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Weiler
Tierarzt aus Duisburg

Berlin 1985
Journal Nr.
1238

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner
Referent: Prof. Dr. V. von Bülow
Korreferent: Prof. Dr. J. Schlüns

Tag der Promotion: 28.6.1985

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschungsprogramms über Hühnermakrophagen (Bu 488/1-2/3).

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	7
B. LITERATURÜBERSICHT	9
I. Grundzüge der Immunreaktion	9
II. Zelluläre Grundlagen der Immunität	11
1. Bedeutung und Funktion der Makrophagen als Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen	11
2. Gewinnung und Kultivierung von Makrophagen	13
3. Der Makrophage als Effektorzelle	14
a) Stimulierung und Aktivierung von Makrophagen	14
b) Zytostatische Eigenschaften von Makrophagen	16
c) Phagozytose durch Makrophagen	18
4. Das lymphatische System des Vogels	22
5. Bedeutung von Wechselbeziehungen zwischen Lymphozyten und Makrophagen	23
6. Stimulierung von Lymphozyten	25
III. Immunregulatorische Mediatoren	27
1. Lymphokine	27
a) Allgemeine Übersicht	27
b) Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF)	29
2. Interferone	31
a) Bedeutung und Klassifizierung von Interferonen	31
b) Interferon-γ (IFN-γ)	32

Seite

C. MATERIAL UND METHODEN 37

I. Versuchstiere 37

II. Kulturmedien 37

1. Lymphozytenkulturmedium 37

2. Makrophagenkulturmedium 38

a) Knochenmarksmakrophagen 38

b) Peritonealmakrophagen 38

3. Kulturmedium für Hühnerembryofibroblasten und Kükennierenzellen 38

4. Kulturmedium für lymphoblastoide Zellinien 38

5. Agarosemedium für Plaquetests 39

6. Nährboden für Candida albicans 39

III. Lymphozytenkulturen 39

1. Thymus-Zellkulturen 39

2. Milz-Zellkulturen 40

3. Zellkulturen aus Bursa Fabricii 41

IV. Makrophagenkulturen 41

1. Peritonealmakrophagen 41

2. Knochenmarksmakrophagen 42

3. Milzmakrophagen 42

V. Andere Zellkulturen 43

1. Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Kulturen 43

2. Kükennieren (KN)-Kulturen 43

3. Lymphoblastoide Zellen 44

VI. Candida albicans-Kulturen 44

VII. Anreicherung von T-Lymphozyten über Nylonfaser-Säulen 44

Seite

VIII. Gewinnung und Untersuchung von Lymphokinen 45

IX. Untersuchung zytostatischer Wirkungen kultivierter Makrophagen nach unterschiedlichen Behandlungen 46

X. Untersuchung der Phagozytosekapazität und -aktivität kultivierter Makrophagen nach unterschiedlichen Behandlungen 47

XI. Untersuchung von Makrophagenkulturen auf die Bildung von mehrkernigen Zellen 48

XII. Bestimmung antiviraler Interferon-Aktivität 49

1. Plaquereduktionstest 49

2. Mikro-Interferon-Test 50

XIII. Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften von Lymphokin-Präparationen oder Interferonen 51

D. ERGEBNISSE 53

I. Gewinnung von Lymphokinen aus Lymphozytenkulturen des Huhnes 53

1. Lymphokin-Produktion durch kultivierte Thymuslymphozyten 54

2. Lymphokin-Produktion durch kultivierte Milzlymphozyten 66

3. Lymphokin-Produktion durch kultivierte Bursalymphozyten 82

II. Resultate von Versuchen zur Aktivierung kultivierter Makrophagen 84

1. Morphologische Veränderungen der Makrophagen nach Lymphokin-Behandlung 84

Seite

2. Vorkommen von mehrkernigen Zellen in Makrophagenkulturen 86

3. Abhängigkeit der Phagozytosekapazität und Phagozytoseaktivität kultivierter Makrophagen von der Zellzahl pro Flächeneinheit 88

4. Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phagozytosekapazität und -aktivität kultivierter Peritonealmakrophagen 94

5. Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phazytosekapazität und -aktivität kultivierter Knochenmarksmakrophagen 103

E. DISKUSSION 114

F. ZUSAMMENFASSUNG 132

G. SUMMARY 134

H. LITERATURVERZEICHNIS 136

A. EINLEITUNG

Ein leistungsfähiges Immunsystem gehört zu den wesentlichen Voraussetzungen für die Gesunderhaltung eines Individuums und trägt damit zur Erhaltung der Art bei.
Seit Anfang des letzten Jahrzehnts ist bekannt, daß eine Immunantwort die Summe von zellulären Reaktionen und regulativen Interaktionen darstellt, die auch Rückkopplungs-Mechanismen, d.h. positive und negative Kontrollmechanismen einschließt. Diese Kontrollen nehmen ihren Ursprung in Lymphozyten oder mononukleären Phagozyten, jedoch auch in anderen somatischen Zellen. Sie werden durch verschiedenartige lösliche Mediatoren gesteuert, die man nach ihrem Ursprung als Lymphokine, Monokine und Zytokine bezeichnet. Auch die Interferone sind in diesem Zusammenhang zu nennen.
Da solche Faktoren nur in minimalen, "homöopathisch" geringen Mengen produziert werden, ist ihre chemisch-physikalische Analyse mit außerordentlichen Schwierigkeiten verbunden.
So wurden sie bisher überwiegend aufgrund ihrer biologischen Wirkungen in vitro charakterisiert, wobei man jede biologische Aktivität der Präsenz eines bestimmten Moleküls zuschrieb.
Dies hat zur Beschreibung einer verwirrenden Vielzahl der genannten Immun-Regulatoren geführt, ohne daß allerdings gesagt werden kann, inwieweit nicht verschiedenartige biologische Aktivitäten durch ein und dasselbe Molekül bewirkt werden.
Den Untersuchungen lagen hierbei zumeist Lymphozytenpopulationen von Nagern oder vom Menschen zugrunde.
Obwohl die Vögel den Reptilien phylogenetisch näherstehen als den Säugern, gehört das aviäre Immunsystem zu den am höchsten differenzierten Abwehrsystemen. Trotzdem sind aviäre Lymphokine und andere vergleichbare Immunregulatoren der Vögel bisher nur unzureichend und lückenhaft untersucht worden.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen experimentellen Beitrag zur Produktion von Lymphokinen durch Hühnerlympho-

zyten in vitro zu liefern.
Aus der Vielzahl möglicher Lymphokin-Aktivitäten wurden zwei zur näheren Untersuchung ausgewählt. Es handelt sich hierbei um den Makrophagen-aktivierenden Faktor (MAF) und um das Immun-Interferon (IFN-γ). Sie wurden zunächst aufgrund ihrer biologischen Effekte in Zellkulturen charakterisiert. Neben der Induzierung zytostatischer Eigenschaften kultivierter Knochenmarksmakrophagen wurde die Beeinflussung der unspezifischen Phagozytosekapazität und -aktivität von Knochenmarks- sowie Peritonealmakrophagen zur Beschreibung der Lymphokin-Eigenschaften herangezogen. Die Präparation von Lymphokinen und deren Charakterisierung standen daher in unmittelbarem Zusammenhang mit Untersuchungen über die Makrophagenaktivierung in vitro.
Die zusätzliche Untersuchung antiviraler Wirkungen von Lymphokin-Präparationen diente insbesondere zum Nachweis von Gamma-Interferon.
Die Versuche zur Optimierung und Standardisierung der Produktion aviärer Lymphokine sollten die Grundlage für nachfolgende Untersuchungen schaffen, nämlich über Möglichkeiten einer Reinigung und chemisch-physikalischen Charakterisierung insbesondere der Lymphokine MAF und IFN-γ.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten die Untersuchungen von Klasen (1983) sowie Bülow und Klasen (1983b) über die Aktivierung kultivierter Hühnermakrophagen weitergeführt und ergänzt werden. Die genannten Autoren beschreiben zwar Lymphokin-induzierte zytostatische Wirkungen kultivierter Makrophagen sowie damit einhergehende Veränderungen der Enzymsekretion und der Morphologie der behandelten Zellen, gehen jedoch nicht näher auf die Gewinnung von Lymphokinen ein. Auch bleiben die Phagozytosekapazität und -aktivität Lymphokin-behandelter Makrophagen als zusätzliche Parameter der Makrophagen-Aktivierung unberücksichtigt. Daher erschien es notwendig, die früheren Untersuchungen in diesen Punkten zu ergänzen.

B. LITERATURÜBERSICHT

Die folgende Literaturübersicht ist wegen des inzwischen fast unüberschaubar umfangreichen Schrifttums selbst über Teilaspekte der immunologischen Forschung notwendigerweise lückenhaft und keineswegs erschöpfend. Sie soll einerseits grundlegende Zusammenhänge verständlich machen und andererseits in die besondere Problematik einführen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit dem experimentellen Teil dieser Arbeit steht. Spezielle Forschungsergebnisse anderer Autoren sollen im übrigen in die Diskussion der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen einbezogen werden.

I. Grundzüge der Immunreaktion

Die immunologische Abwehrreaktion eines Organismus gegen antigene Reize, wie sie z.B. durch Viren und Bakterien, aber auch durch Neoplasien und Zelltransplantate ausgelöst werden kann, ist durch eine komplexe Interaktion zwischen Antigen, sogenannten antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten gekennzeichnet (Unanue, 1981; Unanue et al., 1984).
Sie läßt sich nach Klein (1982) durch einen dreiphasigen Ablauf charakterisieren:

1) Erkennung (recognition)
2) Verarbeitung (processing)
3) Antwort (response)

Die erste Phase umfaßt die Erkennung der Fremdstruktur sowie die darauf folgende Stimulierung von Lymphozyten (Katz und Benacerraf, 1972; Unanue, 1972). Ein Erkennen des Antigens erfolgt entweder über noch nicht identifizierte membranständige Strukturen der antigenpräsentierenden Zellen ("unspezifischer Rezeptor") oder über zellgebundene spezifische Rezeptoren. Insbesondere die Bindung von Immunglobulin an Fc- oder C3b-Rezeptoren von Makrophagen ist in diesem Zusammenhang zu nennen.

Während der zweiten Phase kommt es als Ausdruck einer immunologischen Verarbeitung der antigenen Information zur Proliferation und Teilung stimulierter T- bzw. B-Lymphozyten (Howard, 1982; Dutton und Swain,1982). In Gegenwart des Antigens entstehen infolge fortgesetzter Proliferation der stimulierten Zellen zahlreiche Tochterzellen. Durch diese klonale Expansion wird die Zahl der auf das auslösende Antigen ansprechbaren T- bzw. B-Zellen erheblich vergrößert. Darüberhinaus kann der antigene Reiz bei den B-Lymphozyten unter anderem deren Differenzierung zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle auslösen, während bei den T-Lymphozyten verschiedene Subpopulationen, wie z.B. zytotoxische T-Zellen entstehen können. Die so bereitgestellten Tochterzellen leiten durch die Entfaltung ihrer funktionellen Vielfalt die dritte Phase der Immunreaktion, die Immunantwort ein.
Sie kann als überwiegend humorale Immunantwort verlaufen, die regelmäßig von einem der peripheren lymphatischen Organe ausgeht, oder überwiegend in Form der zellulären Immunreaktion, die auch außerhalb des lymphatischen Gewebes durch zirkulierende T-Lymphozyten ausgelöst werden kann (Keller, 1981a).

Die Immunreaktion eines Organismus unterliegt nicht nur beim Säuger, sondern auch beim Huhn, zumindest in Teilbereichen, einer genetischen (Paul, 1984; Schwartz, 1984; Sharma und Tizard, 1984; Sachs, 1984; Kindt und Robinson, 1984) und zentralnervösen Kontrolle (Besedovsky et al., 1983; Blalock, 1984). Sie ist unter anderem abhängig vom Lebensalter (Makinodan und Kay, 1980; Sharma und Tizard, 1984) und der Ernährung (Chandra und Newberne, 1977; Weeks, 1979; Chandra, 1983) des Individuums, sowie von der Natur, d.h. Immunogenität des Antigens (Unanue und Calderon, 1975; Berzofsky und Berkower, 1984).

II. Zelluläre Grundlagen der Immunität

1. Bedeutung und Funktion der Makrophagen als Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen

Bei allen Unterschieden in der Art der Immunantwort (humoral bzw. zellulär) verläuft der Beginn der Reaktion jedoch in weitgehend uniformer Weise, da die Lymphozyten des Immunorgans nur dann aktiviert werden können, wenn ihnen das zu bekämpfende Antigen von körpereigenen antigenpräsentierenden Zellen in geeigneter Form dargeboten wird (Unanue et al., 1984).
Zu diesen zählen neben den Makrophagen auch die dendritischen Zellen (Steinman und Cohn, 1973, 1974, 1975; Steinman et al., 1979; Oliver und LeDouarin, 1984), die epidermalen Langerhans-Zellen (Stingl et al., 1978, 1981), die B-Lymphozyten (Chesnut et al., 1982a,b; Grey et al.,1982; Issekutz et al., 1982; Chu et al., 1984) sowie Endothelzellen (Burger et al., 1982; Groenewegen und Buurman, 1984) und unter bestimmten Umständen auch endokrine Epithelzellen (Londei et al., 1984; Bottazzo, 1984; Davies, 1984; Todd et al., 1984).

Die Makrophagen nehmen unter den antigenpräsentierenden Zellen eine zentrale Stellung ein. Ihr Vermögen, Antigene zu binden und nach einer immunologischen Aufbereitung membrangebunden immunkompetenten Lymphozyten präsentieren zu können (Unanue und Calderon, 1975; Oppenheim und Seeger, 1976; Rosenthal et al., 1976; Allen und Unanue, 1984), unterscheidet sie von anderen Phagozyten wie z.B. den neutrophilen Granulozyten des Säugers, den heterophilen Granulozyten des Huhnes oder den aviären Thrombozyten (Carlson et al., 1968; Sterz und Weiss, 1973, 1974; Enbergs, 1975; Braun-Munzinger, 1981; Tizard, 1981) und macht sie zu den wichtigsten akzessorischen Zellen bei der Auslösung spezifischer Immunreaktionen (Shevach, 1984). Die Bedeutung der Makrophagen wird unter anderem dadurch unterstrichen, daß Antigene, die von Makrophagen nur schlecht oder gar nicht aufgenommen werden, eine nur schwache Immunantwort auszulösen vermögen. Polymere oder an Antikörper bzw. Komplement gebundene Antigene

werden besonders leicht aufgenommen.

Der Begriff Makrophage (Metchnikoff, 1892) beschreibt eine Klasse von Zellen, die aufgrund morphologischer, funktioneller sowie ontogenetischer Gemeinsamkeiten als Differenzierungsstufe eines eigenen Zellsystems aufgefaßt wird. Dieses sogenannte "mononuclear phagocytic system" (van Furth, 1970), das inzwischen auch mit Hilfe monoklonaler Antikörper näher definiert werden konnte (Austyn und Gordon, 1981; van Voorhis et al., 1983), erstreckt sich von den Makrophagen über ihre Vorläufer im Blut, die Monozyten, bis zu deren Vorstufen im Knochenmark, den Promonozyten und Monoblasten (van Furth, 1970). Es repräsentiert einen wesentlichen Teil der von Aschoff (1924) zum retikuloendothelialen System zusammengefaßten Zellen.

Im gesunden Gewebe sind Makrophagen ruhende Zellen mit niedriger Stoffwechselaktivität (Steinman und Cohn, 1975; Takemura und Werb, 1984). Dagegen zeigen sie im Rahmen von Entzündungsprozessen und zellvermittelten Immunreaktionen eine aktive, auf den Ort des Reizes gerichtete Wanderung, sowie insbesondere bei granulomatösen Reaktionen eine gesteigerte lokale Proliferation (Spector, 1970; Spector und Ryan, 1970; Dannenberg, 1975; Bitterman et al., 1984). Die Anzahl der gewebeständigen Makrophagen ist jedoch im allgemeinen viel zu gering, als daß eine effektive Auseinandersetzung mit Mikroorganismen oder Noxen anderer Art möglich wäre (van Furth und Willemze, 1979).
So sezernieren diese residenten Makrophagen als Reaktion auf einen antigenen Reiz den bereits intrazellulär gespeicherten "factor increasing monocytopoiesis" (FIM), der auf humoralem Wege zu einer Erhöhung der Monozytenzahl führt (van Furth et al., 1973; van Waarde et al., 1977a,b; Sluiter et al., 1982). Monozyten wandern aus Blutgefäßen aktiv durch Transmigration (Sandritter und Beneke, 1974) in das Gewebe ein und differenzieren sich zu Makrophagen (van Furth, 1980). Sie stellen im histopathologischen Bild die überwiegende zelluläre Komponente der mononukleären Infiltrate, insbesondere bei Immunreaktionen vom verzögerten Typ (Sandritter und Beneke, 1974).

Nach van Furth (1980) entstehen alle Gewebs- und Organmakrophagen durch spezifische Differenzierungsvorgänge von eingewanderten Monozyten; die Fähigkeit zur Zellteilung haben Monozyten wie Makrophagen in der Regel verloren, mit Ausnahme der Kupfferschen Sternzellen.
Demgegenüber differenzieren sich nach Meinung anderer Autoren (Daems und Broderoo, 1973; Daems et al., 1975, 1976; Volkman, 1976) nur die im Verlaufe einer Entzündung auftretenden Makrophagen aus Blutmonozyten, während sich unter physiologischen Verhältnissen die Makrophagenpopulation durch Proliferation und Teilung der bereits vorhandenen Zellen ("resident macrophages") erhält und erneuert.

2. Gewinnung und Kultivierung von Makrophagen

Beim Huhn bieten sich für in vitro Untersuchungen verschiedene Makrophagenpopulationen an. Die Gewinnung von Makrophagenvorläuferzellen aus dem Knochenmark spezifiziert pathogenfreier Tiere ermöglicht die Kultivierung unbeeinträchtigter, d.h. nicht stimulierter Zellen. Demgegenüber lassen sich stimulierte oder aktivierte Makrophagen aus dem Peritonealraum nach Induzierung einer Peritonitis gewinnen (Klemm, 1983).
Wegen ihrer Fähigkeit zur Adhärenz auf Glas- und Plastikoberflächen (van Furth et al., 1972; Adams, 1979) lassen sich Makrophagen leichter als andere Immunzellen isolieren und für Untersuchungen in vitro nutzen. Der mit Hilfe der Adhärenz erzielbare Reinigungseffekt ist allerdings nicht vollständig, denn auch andere Zellen besitzen die Fähigkeit, zumindest vorübergehend in den Kulturgefäßen zu adhärieren. Hierzu zählen in erster Linie Thrombozyten, die beim Huhn zugleich hochaktive Phagozyten darstellen (Glick et al., 1964; Carlson et al., 1968; Grecchi et al., 1980; Ries et al., 1983). Allerdings sind sie extrem empfindlich (Carlson et al., 1968) und gehen unter Makrophagenkulturbedingungen ebenso wie Granulozyten und Lymphozyten schnell zugrunde (Adams, 1979). Technisch bedingte Verunreinigungen mit Fibroblasten, wie sie Rangan (1967) in Kulturen von Peritonealmakro-

phagen beobachtete, können auf diese Weise ebenfalls nicht beseitigt werden.

3. Der Makrophage als Effektorzelle

Bei Entzündungsprozessen anfallende lösliche Faktoren, exogene und endogene Chemotaxine (Wilkinson, 1974; Wissler et al., 1974) und insbesondere Lymphokine (Adelman et al., 1979), bewirken nicht nur eine gezielte Einwanderung von Monozyten bzw. Makrophagen an den Ort des Reizes und das Festhalten der mononukleären Phagozyten in diesem Bereich, sondern auch eine Änderung ihres Funktionszustandes. Diese Veränderung normaler Makrophageneigenschaften tritt in vivo hauptsächlich als Folge einer Auseinandersetzung mit eindringendem Antigen bei Infektionen auf. Auch unter Kulturbedingungen lassen sich Makrophagen durch zahlreiche Faktoren in ihrer funktionellen Aktivität beeinflussen. Damit können Effekte bestimmter Reize oder Behandlungen auf Makrophagen unabhängig von anderen Zellen genauer analysiert werden.

a) Stimulierung und Aktivierung von Makrophagen

In Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Reiz und im Hinblick auf funktionelle Unterschiede werden "inflammatory macrophages" von "activated macrophages" unterschieden (Takemura und Werb, 1984).

"Inflammatory macrophages", auch als "stimulated macrophages" bezeichnet (Ögmundsdottir und Weir, 1980), sind durch spezifische Entzündungsfaktoren, wie z.B. Endotoxin, Thioglykolat, Proteose-Pepton oder Mineralöl stimuliert (Rosenstreich, 1981). Sie lassen sich experimentell aus Peritonealexsudaten von Säugern sowie vom Huhn gewinnen.
Entzündungsmakrophagen besitzen eine hohe sekretorische Aktivität, wobei jedoch das Sekretionsspektrum in Abhängigkeit vom

Entzündungsinduktor variiert (Werb et al., 1980a,b; Werb und Chin, 1984). Sie besitzen keine gesteigerte mikrobizide oder tumorizide Aktivität.
Von den stimulierten Makrophagen sind die aktivierten Makrophagen abzugrenzen (Mackaness, 1970). Aktivierte Makrophagen sind durch Lymphozytenprodukte, wie Lymphokine oder Interferone in ihrem Funktionszustand beeinflußt. Sie lassen sich experimentell aus Versuchstieren gewinnen, z.B. nach chronischen Infektionen durch Bacillus-Calmette-Guerin (BCG), Listerien oder Corynebakterien (Rosenstreich, 1981).
Obwohl bis heute kein zuverlässiger biochemischer Parameter existiert, durch den ein Makrophage mit hinreichender Empfindlichkeit als aktiviert charakterisiert werden kann (Bromberg und Pick, 1983), so wurde doch eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, um typische Kriterien für die Aktivierung zu erarbeiten (North, 1978).

Makrophagen können hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades aufgrund morphologischer, funktioneller sowie biochemischer Merkmale charakterisiert werden (Allison und Davies, 1974).
Morphologisch zeichnen sich aktivierte kultivierte Makrophagen meist durch das vermehrte Auftreten zytoplasmatischer Vakuolen (Lysosomen und pinozytotische Vakuolen) und eine Zunahme der Zellgröße, sowie durch lebhafte Membranbewegungen (sog. ruffled membranes) aus. In vielen Fällen nehmen die Zellen zusätzlich eine unregelmäßig langgestreckte Form an, und sie zeigen eine erhöhte Adhärenz auf Glas- und Plastikoberflächen (Blanden, 1968; Rabinovitch und DeStefano, 1973a,b, 1974; David, 1975; Rabinovitch und Hamburg, 1980; Donaldson et al., 1984).
Nicht aktivierte Makrophagen besitzen eine niedrige allgemeine sekretorische Aktivität. Im Verlauf der Aktivierung kommt es oft zu einer Steigerung des Energiestoffwechsels und der Proteinsynthese. Neben einer Zunahme der Produktion verschiedener lysosomaler Enzyme ist außerdem eine Steigerung der oxidativen Stoffwechselvorgänge und damit einhergehend ein erhöhter Anfall von H_2O_2 festzustellen. Bei der Wasserstoffsuperoxydbildung entsteht ein hochaktives Sauerstoffradikal (O_2^-). Die anfallende Menge der freien Superoxyd-Anionen hat einen wichtigen Einfluß auf die mikrobizide und tumorizide Wirkung aktivierter

Makrophagen (Cohn, 1978; North, 1978; Karnovsky und Lazdins, 1978), wobei die mikrobizide Wirkung eng mit der phagozytotischen Aktivität der Makrophagen verbunden ist (Quie et al., 1982).

b) Zytostatische Eigenschaften von Makrophagen

Makrophagen besitzen das Vermögen, entweder direkt oder mittels löslicher Faktoren die Differenzierung, die Proliferation und die Lebensfähigkeit anderer Zellarten nachhaltig zu beeinflussen, zu fördern oder zu hemmen (Leibovich und Ross, 1976; Keller, 1976b; Polverini et al., 1977).
Der Verlauf der Interaktion zwischen Makrophagen und Zielzellen wird dabei wesentlich durch den aktuellen Funktionszustand der Makrophagen beeinflußt. So können aktivierte Makrophagen in vitro zytotoxische Eigenschaften gegenüber Tumorzellen haben (Schultz und Chirigos, 1980).
Jedoch auch in vivo vermögen sie das Wachstum von primären Tumoren zu hemmen (Freedman et al., 1980) und eine Metastasierung zu verhindern (Fidler, 1974; Tsuchida et al., 1981).
Fidler (1980) nutzte die antiproliferativen Eigenschaften von in vivo aktivierten Makrophagen zur Therapie spontan metastasierender Melanome. Er injizierte Mäusen Liposomen, die das Lymphokin "Makrophagen-aktivierender Faktor" enthielten und erreichte damit eine signifikante Reduktion der Metastasenbildung.

Die zytotoxischen Wirkungen von Makrophagen auf proliferierende Tumorzellen lassen sich in eine zytolytische und in eine zytostatische Komponente unterteilen (Evans und Alexander, 1976; Keller, 1976b).
Während die zytolytischen Effekte ausschließlich gegen Tumorzellen gerichtet sind, erstrecken sich die zytostatischen Wirkungen auch auf normale Zellen (Kirchner et al., 1975; Keller, 1975; Meltzer et al., 1975; Keller, 1976a; Fidler et al., 1978).
Alle schnellwachsenden Zellen, unabhängig davon, ob sie syngenen,

allogenen oder xenogenen Ursprungs sind, werden durch aktivierte Makrophagen im Wachstum gehemmt (Keller, 1974). Damit haben Makrophagen nach Keller (1974) im Organismus eine regulierende Funktion bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Zellwachstums.
Normale Makrophagen lassen sich durch verschiedene Faktoren zur Entwicklung zytostatischer Eigenschaften anregen. Zu den wenigen Untersuchungen, die in diesem Zusammenhang mit Hühnermakrophagen durchgeführt wurden, gehören die Arbeiten von Lee et al. (1978) und Sharma (1980).
Lee et al. (1978) zeigten, daß Makrophagen von Hühnern, die mit dem Virus der Marekschen Krankheit (MDV) infiziert waren, die DNS-Synthese lymphoblastoider Zellinien hemmen können, und Sharma (1980) wies nach, daß auch nicht aktivierte Makrophagen beim Huhn in der Lage sind, das Wachstum lymphoblastoider Zellen zu supprimieren. Sie müssen dazu nur in einer vielfach höheren Konzentration vorliegen als Makrophagen MDV-infizierter Küken.

Im Rahmen ihrer Funktion als Effektorzellen der zellvermittelten Immunantwort (Evans und Alexander, 1976) kommt der Aktivierung von Makrophagen durch Interferone und Lymphokine besondere Bedeutung zu (Chirigos et al., 1980; Mochizuki et al., 1984). Klasen (1983) konnte zeigen, daß die zytostatischen Wirkungen Lymphokin-aktivierter Hühnermakrophagen vom Beginn und von der Dauer der Lymphokin-Behandlung abhängig waren. Die Stärke der zytostatischen Wirkungen war im Gegensatz zu den Beobachtungen an nicht aktivierten Makrophagen nur wenig durch eine Veränderung des Effektor:Targetzellverhältnisses zu beeinflussen.
Die zytostatische Wirkung der Makrophagen gegenüber Tumorzellen beruht auf einer Suppression ihrer DNS-Synthese (Keller, 1976b, c). Auf welchem Wege es zu dieser Synthese-Hemmung kommt, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Stadecker et al.(1977) führten die Suppression der DNS-Replikation in Tumorzellen auf ein Überangebot an freiem Thymidin zurück, da sie zeigen konnten, daß aktivierte Makrophagen nennenswerte Mengen an Thymidin sezernieren. Curry (1978) fand, daß Mausmakrophagen das Enzym Arginase sezernieren, welches Arginin im Kulturmedium abbaut. Er erklärte die wachstumshemmenden Eigenschaften der Makrophagen

mit einem dadurch bedingten Mangel der Tumorzellen an Arginin. Auch die Sekretion von Prostaglandin E_2 durch aktivierte Makrophagen wurde für die antiproliferativen Wirkungen als ursächlich angenommen (Glaser, 1980; Metzger et al., 1980). Schließlich ist die Empfänglichkeit von Tumorzellen gegenüber zytostatischen Wirkungen aktivierter Makrophagen offensichtlich davon abhängig, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Tumorzelle befindet (Hamilton et al., 1982).

c) Phagozytose durch Makrophagen

Die Aufnahme extrazellulären Materials durch Zellen mittels segmentaler Membraneinstülpung und Bildung von intrazellulären Vesikeln ist für die unspezifische Immunität von großer Bedeutung (Bainton, 1980; Edelston, 1980). Dieser Vorgang, der als Endozytose bezeichnet wird (Silverstein et al., 1977), wurde zuerst in Makrophagen entdeckt, findet aber, wie man inzwischen weiß, in allen tierischen Zellen statt (Palade, 1956), wenn auch mit unterschiedlicher Aktivität. So internalisiert ein Makrophage das Äquivalent seiner Zellmembran alle zwanzig Minuten, ein Fibroblast tut dasselbe alle sechzig Minuten (Steinman et al., 1978, 1983).
Im Hinblick auf die Größe des aufgenommenen Materials wird gewöhnlich unterschieden zwischen Pinozytose (gelöste Makromoleküle, Durchmesser < 1µm) und Phagozytose, bei der Partikel bis zu einem Durchmesser von mehreren Mikrometern aufgenommen werden, wie z.B. Latex-Kugeln oder Erythrozyten (Tulkens et al., 1980).
Die Fähigkeit zur Phagozytose gehört zu den Haupteigenschaften der Makrophagen. Sie tragen durch Phagozytose und intrazellulären Abbau wesentlich zur Ausschaltung von Mikroorganismen, veränderten und geschädigten Zellen oder Zelldebris sowie von Antigen-Antikörper-Komplexen bei (Spicer et al., 1979). Die Phagozytose erfolgt über ein Mikrofilament-Mikrotubulus-System (Enbergs, 1975) und wird mit steigendem Differenzierungsgrad der Zellen zunehmend manifest; periphere Makrophagen sind hoch-

aktive Phagozyten (Spicer et al., 1979).
Eine wichtige Voraussetzung für das Zustandekommen der Phagozytose ist ein enger Kontakt zwischen phagozytierender Zelle und aufzunehmendem Partikel (Rabinovitch, 1967a). Da sowohl die Makrophagen als auch die in den Körperflüssigkeiten suspendierten Partikel in vielen Fällen ein negatives elektrostatisches Oberflächenpotential besitzen, geschieht diese Anlagerung nicht immer spontan (Tizard, 1981). Opsonine in Form von Antikörpern und Komplement reduzieren das Oberflächenpotential eines Partikels und fördern damit seine feste Anlagerung an die phagozytierende Zelle. Diese Anheftung kann durch verschiedene Membranstrukturen des Phagozyten vermittelt werden.
Makrophagen tragen auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Rezeptorenarten, darunter Bindungsstellen für Immunglobulin und Komplement. Die Fc- und die C3b-Rezeptoren sind für die sogenannte spezifische Phagozytose von Bedeutung (van Furth, 1980; Silverstein und Loike, 1980). Sie wurden auch auf Hühnermakrophagen nachgewiesen (Fox und Solomon, 1981).
Die Fc-Rezeptoren der mononukleären Phagozyten stellen eine heterogene Gruppe von spezifischen Bindungsstellen für verschiedene Unterklassen von Ig G (Unkeless und Eisen, 1975; Unkeless, 1977; Heuser et al., 1977; Diamond et al., 1978), wie auch für monomeres Ig M dar (Roubin und Zolla-Pazner, 1979; Rosenstreich, 1981). Sie vermitteln sowohl die Anlagerung als auch die Aufnahme von antikörperbeladenen Partikeln (Rabinovitch, 1970; Mantovani et al., 1972; Bianco et al., 1975).
C3b-Rezeptoren sind spezifische Bindungsstellen für ein Spaltprodukt der C3-Komponente von Komplement (van Furth, 1980; Silverstein und Loike, 1980). Sie vermitteln auf normalen Peritonealmakrophagen der Maus lediglich die Anheftung von Partikeln an die Zelle (Mantovani et al., 1972; Bianco et al., 1975; Griffin et al., 1975). Auf aktivierten Makrophagen dagegen vermitteln sie sowohl die Anlagerung opsonierter Partikel, wie auch deren Aufnahme (Bianco et al., 1975; Morland und Kaplan, 1977; Edelson und Erbs, 1978; Mantovani, 1981).
Die Bindungsstellen für Immunglobulin und Komplement sind, obwohl sie gleiche Aufgaben erfüllen, voneinander unabhängig (Michl et al., 1980).

Neben dieser, an die Anwesenheit von Opsoninen gebundenen Phagozytoseform wurde in vitro auch eine sogenannte unspezifische, d.h. nicht immunologische Phagozytose durch Makrophagen nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, daß normale Erythrozyten, Glutaraldehyd-behandelte Erythrozyten und zahlreiche Partikel, wie Zymosan, Latex-Kugeln oder Stärke auch in Abwesenheit von Serumfaktoren phagozytiert werden (Rabinovitch, 1967b; Rabinovitch und DeStefano, 1973c). Normale Erythrozyten wurden dabei allerdings nur von jenen Zellen phagozytiert, die sich bereits morphologisch von den anderen Phagozyten der Kultur aufgrund einer verstärkten flächenmäßigen Ausbreitung unterscheiden ließen (Rabinovitch und DeStefano, 1973).
Ezekowitz et al. (1983) untersuchten erstmals, inwieweit ein Mangel an Serumfaktoren durch Ausschüttung makrophageneigener Faktoren mit opsonierender Wirkung, wie Komplement (Hartung und Hadding, 1983), kompensiert werden kann. Sie wiesen nach, daß Zymosan-Partikel sowohl über Komplementrezeptoren als auch über Rezeptoren für Kohlenhydrate (Mannose/Fucose-Rezeptor) phagozytiert werden können, und daß diese Rezeptoren voneinander unabhängig sind. Die Aufnahme über C3b-Rezeptoren war allerdings an eine vorherige lokale Opsonierung durch makrophageneigenes Komplement gebunden. Darüberhinaus erforderte sie im Gegensatz zu der Carbohydratrezeptor-vermittelten Phagozytose eine intakte Proteinsynthese des Phagozyten.
Die erfolgreiche Abwehr von Mikroorganismen mittels Phagozytose und intrazellulärem Abbau setzt voraus, daß der Phagozyt die Oberfläche des Partikels als fremd erkennt. Den Erkennungsmechanismen, die zur unspezifischen Phagozytose führen, liegt in vielen Fällen eine Wechselwirkung zwischen membranständigen Kohlenhydraten und Oberflächenlektinen zugrunde (Sharon, 1984). So können lektinähnliche Substanzen auf der Oberfläche einiger Stämme von Escherichia coli und Salmonella typhi zur Adhärenz dieser Partikel an Phagozyten führen (Bar-Shavit et al., 1977), jedoch auch eine Anheftung an Epithelzellen vermitteln (Beachey, 1982).
Umgekehrt können lektinähnliche Substanzen auf Makrophagenoberfächen als Rezeptoren fungieren, die die entsprechenden Kohlenhydrate (komplementären Carbohydratgruppen) auf Bakterienober-

flächen erkennen (Ögmundsdottir und Weir, 1976; Warr, 1980; Glass et al., 1981).
Verschiedene Autoren untersuchten das Phagozytoseverhalten von Hühnermakrophagen für Candida albicans (Rossi und Weiler, 1982; Rossi und Himmelhoch, 1982; Rossi et al., 1983) in Abwesenheit von Serumfaktoren. Sie konnten zeigen, daß die Phagozytose der Hefe durch einen Rezeptor mit hoher Spezifität für Mannose vermittelt wird. Mannose ist ein wesentlicher Baustein der äußeren Zellwand von Candida albicans (Cassone et al., 1978; Sandin et al., 1982). Der Mannangehalt der Zellwand wiederum ist umgekehrt proportional zur Pathogenität der Hefe für Hühner (Weeks et al., 1976). Fox und Solomon (1981) konnter ferner zeigen, daß die Phagozytoseleistung kultivierter Milzmakrophagen des Huhnes für Candida albicans sowohl vom Alter der Zellkultur wie auch vom Alter des Spendertieres abhängt.

Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität kultivierter Makrophagen ist für die Identifizierung dieser Zellen von Bedeutung, und sie erlaubt eine Charakterisierung ihres Funktionszustandes.
So zeigen aktivierte Makrophagen zumeist eine erhöhte Phagozytoserate gegenüber Mikroorganismen und eine damit einhergehende verstärkte bakterizide Aktivität (Mackaness, 1970). Doch ist die Veränderung der phagozytischen Aktivität im Einzelfall von den Induktoren abhängig, die zur Aktivierung oder auch zur Stimulierung der Makrophagen eingesetzt wurden und von den Eigenschaften der zur Phagozytose angebotenen Partikel. Darüber hinaus ist das zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität verwendete Testsystem von großer Bedeutung für eine Aussage über ein verändertes Phagozytoseverhalten der Zellen.
Peritonealmakrophagen der Maus, die mit Lymphokinen aktiviert oder durch Thioglykolat stimuliert wurden, zeigen eine erhöhte Fc-Rezeptor-abhängige und C3b-Rezeptor-vermittelte Phagozytoseaktivität (Coleman et al., 1983). Demgegenüber ist die Phagozytose über Fc-Rezeptoren und Bindungsstellen für Mannose in BCG-stimulierten Peritonealmakrophagen der Maus herabgesetzt (Ezekowitz und Gordon, 1982).
Die sogenannte unspezifische Phagozytose von Escherichia coli durch Peritonealmakrophagen der Maus konnte durch niedrige

Interferondosen deutlich gesteigert werden, während hohe Konzentrationen ($>10^4$ I.E. pro ml) von Interferon zu einer Verminderung der unspezifischen Phagozytose führten (Degré und Rollag, 1980).

4. Das lymphatische System des Vogels

Das lymphatische System des Vogels unterscheidet sich besonders durch drei Merkmale vom Säugersystem (Firth, 1977):

1) Der Vogel besitzt eine Bursa Fabricii
2) Es gibt daher eine anatomische und eine funktionelle Unterteilung des lymphatischen Systems
3) Lymphknoten, die denen der Säugetiere gleichen, fehlen.

Die Dichotomie des lymphatischen Systems wurde erstmals beim Vogel beschrieben (Warner et al., 1962), nachdem Glick et al. (1956) zeigen konnten, daß die Exstirpation der Bursa Fabricii eine verminderte Antikörperbildung zur Folge hat. Demgegenüber führt eine Thymektomie zu herabgesetzten immunologischen Reaktionen (Aspinall et al., 1963), beeinflußt jedoch die Antikörperbildung nur wenig (Cooper et al., 1966).
Die Stammzellen der beiden lymphatischen Systeme stammen aus Mesenchymzellen des Dottersackes und während der späteren Ontogenese aus der embryonalen Leber und dem Knochenmark (Moore und Owen, 1967).
Die Lymphozyten entstehen im sogenannten Lympho-Myeloiden-Komplex, der aus Knochenmark, Bursa, Thymus, Milz, Lymphknoten, subepithelialem lymphoidem Gewebe und Bindegewebe besteht. Diese verschiedenen Gewebekompartimente sind durch Lymphozytenströme verbunden, die sich im Blut überkreuzen und überlagern (Yoffey, 1970; Raff et al., 1970; Toivanen et al., 1981). Aus diesem Grunde sind die Blutlymphozyten die heterogenste und am schnellsten wechselnde Lymphozytenpopulation des Körpers (Strober, 1972). Albini und Wick (1974) untersuchten das Vorkommen und die Verteilung von T- und B-Lymphozyten in verschiedenen lymphatischen Organen bei Hühnern der Rasse "Weiße Leghorn". Sie konnten zei-

gen, daß bei 4-7 Wochen alten Tieren der Anteil von T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation der lymphoiden Zellen des Thymus zwischen 95% und 100% beträgt. Dagegen fanden sie in der Milz von Tieren derselben Altersklasse einen relativen Anteil von 50% bis 60% T-Lymphozyten, während dieser Anteil in der Bursa Fabricii unter 20% lag.
Die Anreicherung von T-Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen des Huhnes mittels Nylonfaser-Säulen beschrieben Stinson et al. (1978) sowie Lamont und van Alten (1981).

5. Bedeutung von Wechselbeziehungen zwischen Lymphozyten und Makrophagen

Bereits in früheren Untersuchungen wurde die Notwendigkeit der Anwesenheit von Makrophagen für die Antigen-induzierte Proliferation von T-Lymphozyten beim Säuger herausgestellt (Hersh und Harris, 1968; Cline und Sweet, 1968; Seeger und Oppenheim, 1970). Aber auch für die Antikörperproduktion durch kultivierte B-Lymphozyten des Huhnes sowie für die aviäre T-Zell-vermittelte Immunität wurde die essentielle Rolle der Makrophagen nachgewiesen (Evans und Ivanyi, 1975; Palladino und Thorbecke, 1978; Vainio und Ratcliffe, 1984).
Die Natur dieser zellulären Interaktion konnte jedoch erst näher verstanden werden, nachdem bekannt wurde, daß solche Wechselbeziehungen der genetischen Kontrolle durch Teile des Haupthistokompatibilitätskomplexes unterliegen (Rosenthal und Shevach, 1973; Shevach und Rosenthal, 1973) und ein Lymphozyt Antigen nur in Assoziation mit Produkten seines eigenen Haupthistokompatibilitätskomplexes erkennt (Zinkernagel et al., 1978).
Der Haupthistokompatibilitätskomplex umfaßt eine Gruppe von Genen, die ein molekulares Orientierungssystem kodiert, welches eine effektive Unterscheidung zwischen eigen und fremd ermöglicht (van Dam, 1981; Cohen, 1983). Wie Untersuchungen an Mäusezellen zeigten, erfordert die Erkennung von an die Makrophagen gebundenem Antigen durch T-Zellen eine Übereinstimmung der Reak-

tionspartner bezüglich der Ia-Antigene (Thomas et al., 1977; Nadler et al., 1980).
Aufgrund biochemischer Analysen und Untersuchungen zum Vorkommen auf verschiedenen Zellarten werden die BL-Antigene des Huhnes als homolog zu den murinen Ia- und humanen HLA-DR Antigenen gesehen (Pink et al., 1977; Ewert und Cooper, 1978).
Die BL-Antigene konnten hauptsächlich auf Lymphozyten und Monozyten bzw. Makrophagen nachgewiesen werden (Ewert und Cooper, 1978; Peck et al., 1982), wo sie im Rahmen der Antigenpräsentation und der Aktivierung von T-Lymphozyten eine den Ia-Antigenen vergleichbare Funktion haben (Peck et al., 1982).

Für die Aktivierung von Lymphozyten sind darüber hinaus verschiedene Sekretionsprodukte der Makrophagen von Bedeutung. Zu diesen zählt das Interleukin 1 (IL-1) (Dinarello, 1984). Der Begriff Interleukin 1 wurde geprägt, um verschiedene, eng verwandte oder möglicherweise sogar identische biologische Faktoren, die bisher unterschiedliche Namen trugen, unter einer Bezeichnung zusammenzufassen. Der Name Interleukin 1 steht damit stellvertretend für "lymphocyte-activating factor" (LAF), "endogenous pyrogen" (EP), "leukocytic endogenous mediator" (LEM) sowie "mononuclear cell factor" (MCF).
Die Freisetzung von IL-1 aus Makrophagen führt zur Aktivierung von sogenannten Helfer-T-Lymphozyten und steuert hiermit neben der Lymphokin-Produktion sowohl die Stärke zytotoxischer T-Zell-Reaktionen als auch die Stärke der humoralen Immunantwort, da die Antikörper-Reaktionen gegen komplexe Antigene ebenso wie die zytotoxische T-Zell-Reaktion oder die Lymphokin-Produktion unter der Kontrolle von Helfer-T-Lymphozyten stehen (Dinarello, 1984). Im zweiten Schritt der so in Gang gesetzten Reaktion sezernieren die Helfer-T-Lymphozyten das Interleukin 2 (IL-2), welches früher als "T-cell growth factor" (TCGF) bezeichnet wurde (Gillis et al., 1982; Farrar et al., 1982). Es unterhält nach Bindung an die entsprechenden IL-2-Rezeptoren die Proliferation der bereits durch Antigenkontakt spezifisch sensibilisierten Vorläuferzell-Klone von zytotoxischen T-Zellen bzw. von anderen T-Zell-Subpopulationen. Die derart aktivierten T-Lymphozyten nehmen durch Freisetzung verschiedener Wachstums-

und Differenzierungsfaktoren sowie weiterer Lymphokine nun ihrerseits wieder Einfluß auf den Aktivitätszustand der Makrophagen, beeinflussen aber auch andere Zellen.
Analoga zu diesen beiden lymphozytotropen Hormonen des Säugers, IL-1 und IL-2, wurden von verschiedenen Autoren in den Kulturüberständen Mitogen-stimulierter Milz- und Blutlymphozyten des Huhnes nachgewiesen (Schauenstein et al., 1982; Schauenstein und Hayari, 1983; Schnetzler et al., 1983).

Jedoch auch andere, von mononukleären Phagozyten sezernierte Produkte, wie z.B. Prostaglandine der E-Serie, üben eine regulierende Funktion bei der Interaktion von Lymphozyten und Makrophagen aus (Goldyne und Stobo, 1981).

6. Stimulierung von Lymphozyten

Die Stimulierung von Säugerlymphozyten wie auch von Lymphozyten des Huhnes, die in vivo in der Regel durch einen Antigenkontakt ausgelöst wird, läßt sich auch in vitro durch die Inkubation von Lymphozytenkulturen mit Antigenen oder Mitogenen (Substanzen, die Lymphozyten zur Proliferation anregen) induzieren (Maheswaran und Thies, 1975; Hovi et al., 1978; Scofield und Bose, 1978; Kline und Sanders, 1980; Kristensen et al., 1981, 1982; Thiel und Burkhardt, 1984).
Während Antigen über einen spezifischen Rezeptor selektiv nur bestimmte Zellklone stimuliert (Berzofsky, 1983; Williams, 1984), aktivieren die polyklonal wirksamen Mitogene zahlreiche Klone verschiedener Klassen oder Unterklassen von Lymphozyten unabhängig von ihrer Spezifität (Lis und Sharon, 1977).
Als klassische Mitogene gelten die Phytomitogene. Sie stellen aus Pflanzen extrahierbare Eiweißkörper dar, die spezifisch mit bestimmten Kohlenhydraten reagieren und daher auch als Lektine bezeichnet werden (Lis und Sharon, 1977). Unter diesen stellt das lösliche Concanavalin A (ConA) in seiner tetrameren Form ein reines T-Zell-Mitogen dar, während vernetztes unlösliches ConA auch B-Lymphozyten zu stimulieren vermag (Andersson et al.,

1972; Greaves und Bauminger, 1972; Ashman, 1984).
Die Aktivierung von Lymphozyten durch Mitogene ist ein außerordentlich komplexer Prozeß, der bisher nur beim Säuger eingehend untersucht worden ist. Er wird eingeleitet durch die Anlagerung der Mitogenmoleküle an die zunächst mobil und gleichmäßig auf der Lymphozytenmembran verteilten Rezeptoren, deren maximale Bindungskapazität temperaturabhängig in unterschiedlicher Zeit erreicht wird. Für verschiedene Phytomitogene, wie z.B. ConA, konnte gezeigt werden, daß es sich bei dieser Anlagerung um einen kooperativen Prozeß handelt (Ashman, 1984), der bei 22°C innerhalb von 30 Minuten einen Gleichgewichtszustand (stady-state) erreicht (Chang und Cuatrecasas, 1976).
Nach einer Mitogen-vermittelten lokalen Quervernetzung (cross-linking) der Rezeptoren kommt es im Zusammenwirken mit Teilen des Zytoskeletts innerhalb eines wiederum temperaturabhängigen Zeitraumes zur Konzentration der Liganden-Rezeptor-Komplexe an einem Zellpol (capping) (Ashman, 1984). Für das Phytomitogen ConA konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem "capping" um einen selektiven Membrantransport handelt, da nur die Liganden-Rezeptor-Komplexe konzentriert werden, während gleichzeitig das "capping" anderer Rezeptoren gehemmt wird (Singer, 1974; Oppenheim und Rosenstreich, 1976; Henis, 1984).
Dieser Prozeß ist unter anderem von der Konzentration des Mitogens abhängig. Während bei einem maximalen mitogenen Effekt oft nur ein geringer Teil der potentiellen Bindungsstellen mit dem Liganden besetzt ist, führen zu hohe Mitogenkonzentrationen zu einer Hemmung der Beweglichkeit der Rezeptoren und damit zu einer Abnahme der mitogenen Wirkung (Ashman, 1984).
Gleichzeitig mit dem "capping" kommt es zu einem Anstieg des Membranphospholipidumsatzes und zur Aktivitätserhöhung zahlreicher membranständiger Enzyme (Hirata et al., 1980; Toyoshima et al., 1982; Ashman, 1984). Bereits 5 Minuten nach ConA-Stimulierung läßt sich in der Lymphozytenmembran ein gesteigerter Umsatz von Phosphatidylinositol nachweisen (Ashman, 1984).
Die Folge dieser Membranprozesse ist eine Erhöhung des intrazellulären Spiegels an c-GMP und c-AMP sowie eine Verschiebung des zytoplasmatischen Enzymbesatzes (Ashman, 1984).
Eine Steigerung der Proteinsynthese läßt sich bereits 2-3 Stun-

den nach ConA-Stimulierung nachweisen, eine Aktivierung der RNS-Synthese nach 6 Stunden (Udey und Parker, 1981; Ashman, 1984). Demgegenüber ist die DNS-Syntheserate jedoch erst nach 24 Stunden erhöht, während eine Lymphokin-Produktion bereits sehr viel früher nachzuweisen ist (Ashman, 1984).

III. Immunregulatorische Mediatoren

1. Lymphokine

a) Allgemeine Übersicht

Lymphokine sind lösliche Botenstoffe, die von Lymphozyten synthetisiert und ausgeschieden werden, nachdem diese durch Antigene oder Mitogene dazu angeregt wurden (Dumonde et al., 1969). Sie werden für relativ kurze Zeitintervalle produziert und sind anerkanntermaßen Ausdruck einer Aktivierung von Lymphozyten (Pick et al., 1979). Die Produktion und Freisetzung von Lymphokinen durch Lymphozyten ist unabhängig von der Proliferation und Teilung der Zellen (Pick und Turk, 1972; Waksman und Namba, 1976).
Lymphokine besitzen keine Immunglobulinstruktur. Sie bilden eine Gruppe unterschiedlicher Moleküle, zumeist Glykoproteine, die mit anderen Zellen, und zwar vornehmlich solchen, die an Immunreaktionen teilnehmen, interagieren können (Rocklin et al., 1980).
In vitro wurden bisher über 100 Lymphokine beschrieben (Klesius, 1982; Oppenheim und Cohen, 1983; Sipka und Szilágyi, 1984). Lymphokine können als Differenzierungsfaktoren oder auch als Wachstumspromotoren wirken. Sie regulieren die Immunantwort, indem sie neue funktionelle Zellen rekrutieren oder bereits differenzierte Zellen proliferieren lassen (Wahl et al., 1978; Wahl und Wahl, 1979; Rocklin et al., 1980; Gilbert und Hoffman, 1982; Brooks et al., 1983; Oppenheim und Cohen, 1983; Postlethwaite et al., 1984).
Lymphokine werden üblicherweise aus Kulturüberständen von

Lymphozytenkulturen gewonnen, die vorher mit Antigen oder vorzugsweise polyklonalen Mitogenen stimuliert wurden (Rocklin et al., 1980; Hübner et al., 1980). Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung derartiger Zellpopulationen, die aus einem Gemisch verschiedener Subpopulationen von Lymphozyten bestehen, werden von derartigen Kulturen eine ganze Reihe unterschiedlicher Lymphokine gleichzeitig oder mit gewisser zeitlicher Verschiebung synthetisiert.
Bödeker et al. (1980) konnten zeigen, daß von Milzlymphozyten der Maus nach ConA-Stimulierung neben IL-2 auch "T-cell replacing factor", "colony stimulating factor", "migration inhibition factor" und "macrophage cytotoxicity factor" produziert werden. Daß diese Aktivitäten auf unterschiedliche Moleküle zurückzuführen sind, konnte durch Auftrennung der einzelnen Faktoren gezeigt werden (Schimpl et al., 1980; Kniep et al., 1981). Vergleichbare Untersuchungen wurden auch mit Milzlymphozyten des Menschen durchgeführt (Bödeker et al., 1984). Dabei zeigte sich, daß die Bedingungen für eine optimale Lymphokin-Produktion in Abhängigkeit vom zu gewinnenden Lymphokin schwanken.

Über aviäre Lymphokine ist bisher nur sehr wenig bekannt. Altman und Kirchner (1972, 1974) konnten aus den Überständen ConA-stimulierter Milzlymphozyten des Huhnes einen die Chemotaxis von Blutmonozyten steigernden Faktor isolieren. Andere Autoren berichten, daß gegen Mycobacterium tuberculosis sensibilisierte Lymphozyten einen Faktor freisetzen, der die Emigration von T-Zellen aus Bursa-, Thymus- und Milzexplantaten verhindert (Timms und Alexander, 1977; Subba Rao und Glick, 1977; Martin und Glick, 1983), aber auch die Migration von Thrombozyten zu hemmen vermag (Stinson et al., 1979; Gilliland et al., 1982). Er wurde daher als aviäres Äquivalent zum "migration inhibiting factor" der Säuger angesehen (Martin und Glick, 1983). Klasen (1983) sowie Bülow und Klasen (1983a,b) fanden in ConA-stimulierten Milzzellkulturen außer einem Makrophagen-aktivierenden Faktor auch Interferon-ähnliche Aktivitäten. Kohase et al. (1983) beobachteten eine spontane Interferon-Produktion in alternden Hühnerembryo-Zellkulturen.
Darüber hinaus wurde von verschiedenen löslichen Faktoren berich-

tet, die als Kostimulatoren die Mitogen-induzierte Proliferation von Lymphozyten zu steigern vermochten (Oates et al., 1972; Schauenstein et al., 1982; Schauenstein und Hayari, 1983).
Zur Messung derartiger Aktivitäten wurden die Zellkulturen von den einzelnen Autoren bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C-42°C) inkubiert (Kirchner und Oppenheim, 1972; Radwan et al., 1975; Chi et al., 1981). Aber auch andere Kulturbedingungen variierten. Während verschiedene Arbeitsgruppen einem serumfreien Zellkulturmedium den Vorzug gaben (Weber, 1970; Kirchner und Oppenheim, 1972; Hovi et al., 1978), entschieden sich andere Autoren für einen Zusatz von hitzeinaktiviertem Hühnerserum oder fötalem Kälberserum (Chi et al., 1981; Pink und Vainio, 1983).
Gleichwohl wurden bisher systematische Untersuchungen über derartige Kulturbedingungen mit aviären Zellen nicht durchgeführt.

b) Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF)

Es ist in zahlreichen in vitro-Untersuchungen gezeigt worden, daß die spezifische Lymphozyten-Antigen-Interaktion zu einer durch Lymphokine vermittelten Aktivierung von Makrophagen führen kann.
So zeigen Makrophagen, die in der Gegenwart von Kulturüberständen Antigen- oder Mitogen-stimulierter Lymphozyten inkubiert wurden, eine Reihe von morphologischen und funktionellen Veränderungen, die als typisch für eine zelluläre Aktivierung angesehen werden. Der Mediator, der solche Effekte in Kulturen von mononukleären Phagozyten induzieren kann, wird als Makrophagen-aktivierender Faktor bezeichnet.
Zu den zellulären Veränderungen, die nach einer 1-3-tägigen Behandlung mit MAF beobachtet werden können, gehören die bereits erwähnte verstärkte Oberflächenadhärenz und die Zunahme der Membranbewegungen (Nathan et al., 1971).
Neben einer erhöhten Pinozytose- und Phagozytoseaktivität (Nathan et al., 1971; Schmidt et al., 1973; Meade et al., 1974)

ist auch eine Zunahme der tumoriziden Kapazität nachzuweisen (Piessens et al., 1975).
Zu den weiteren Veränderungen, die beschrieben wurden, gehören ein verstärkter Energiestoffwechsel (Nathan et al., 1971; Rocklin et al., 1974) und eine erhöhte Proteinsynthese (Pantalone und Page, 1977), die die vermehrte Produktion von Kollagenase (Wahl et al., 1975; Pantalone und Page, 1977) sowie Komplement (Littman und Ruddy, 1977) einschließt.
Es konnte ferner eine Zunahme der Aktivität und Freisetzung von lysosomalen Enzymen und Plasminogenaktivator beobachtet werden (Pantalone und Page, 1977; Klimetzek und Sorg, 1977; Vassali und Reich, 1977), sowie eine verstärkte bakteriostatische und bakterizide Kapazität (Patterson und Youmans, 1970; Fowles et al., 1973).
Trotz intensiver Forschungen konnte bisher nicht geklärt werden, ob es sich bei MAF tatsächlich um ein distinktes Lymphokin handelt, oder ob dieser Faktor nicht vielmehr bestimmte biologische Wirkungen des Immun-Interferon beschreibt.
Ergebnisse neuerer Untersuchungen bei Säugern sprechen allerdings dafür, daß MAF und Immun-Interferon unabhängig voneinander gebildet, und daß die charakteristischen Wirkungen von MAF durch gleichzeitig vorhandenes Interferon potenziert werden können (Pace et al., 1983a,b; Zlotnik et al., 1983; Schultz und Kleinschmidt, 1983; Lohmann-Matthes, 1983; Hamann und Krammer, 1983; Kaltmann et al., 1983; Nathan et al., 1984; Gemsa et al., 1984; Hamann und Krammer, 1984).
Bülow et al. (1984), die diese beiden Aktivitäten erstmals in Kulturüberständen von Mitogen-stimulierten Hühnerlymphozyten beschreiben, kommen ebenfalls zu dem Schluß, daß es sich bei MAF und Immun-Interferon um zwei voneinander verschiedene Lymphokine handelt.

2. Interferone

a) Bedeutung und Klassifizierung von Interferonen

Interferone bilden eine Familie von regulatorischen Proteinen, die die Fähigkeit von Viren, sich in tierischen Zellen zu replizieren, grundlegend beeinflussen können (Vilcek et al., 1980; Baron et al., 1982). Wie man heute weiß, besitzen Interferone neben ihrer antiviralen Aktivität auch andere, z.B. immunregulatorische Eigenschaften (Stewart, 1979).
Interferone werden von tierischen Zellen als Antwort auf verschiedene Inducer produziert und sezerniert (Stewart, 1979).
Die Interferone lassen sich aufgrund antigener, biologischer und biochemischer Eigenschaften in drei Klassen einteilen (Stewart, 1979): Interferon-α, Interferon-ß und Interferon-γ. Sie entsprechen ungefähr den früheren Bezeichnungen Leukozyten-, Fibroblasten- und Immun-Interferon.
Interferon-α und Interferon-ß werden z.B. in Embryofibroblasten-Kulturen aber auch in anderen Zellkulturen durch infektiöses oder UV-inaktiviertes Virus induziert (Stewart, 1979). Abgesehen vom klassischen antiviralen Effekt des IFN-α bzw. IFN-ß (Isaacs und Lindenmann, 1957; Isaacs et al., 1957) sind in den letzten Jahren zahlreiche biologische Wirkungen beschrieben worden, wie z.B. Hemmung des Zellwachstums in vitro (Gresser et al., 1970; Lindahl-Magnusson et al., 1971, 1972; Mc Neill und Fleming, 1971; Mc Neill et al., 1972), Modulation der zellulären und humoralen Immunantwort in vitro (Gisler et al., 1974; Johnson et al., 1975; Heron et al., 1976) und in vivo (Chester et al., 1973; Hirsch et al., 1974; De Maeyer et al., 1975; Brodeur et al., 1975; Finley et al., 1977), gesteigerte Bildung von sogenannten Killer-T-Lymphozyten in vitro (Lindahl et al., 1972; Heron et al., 1976) und Änderungen in der Expression von Oberflächenantigenen (Vignaux und Gresser, 1977). Darüber hinaus wurde beschrieben, daß bei Säuglingsmäusen wiederholte Injektionen von Interferon unter dem Bild einer extensiven Leber-Nekrose zum Tode führten (Gresser et al., 1975, 1980).

b) Interferon-γ (IFN-γ)

Seit der Entdeckung der klassischen, heute als IFN-α und IFN-ß bezeichneten und vorwiegend durch Viren induzierten Interferone (Isaacs und Lindenmann, 1957; Isaacs et al., 1957), wurden verschiedene Interferon-ähnliche Aktivitäten beschrieben, die in vitro wie auch in vivo durch nicht-virale Agentien induziert werden konnten. Zu den Induktoren gehörten Nukleinsäuren von tierischen Zellen (Rotem et al., 1963; De Maeyer et al., 1971; Kimball und Duisberg, 1971), das von Candida albicans produzierte Polysaccharid Mannan (Borecky et al., 1967), die von Streptomyces stammenden Substanzen Kanamycin, Cycloheximid, Lymphomycin und 9-Methylstreptimidon (Lukas und Hruskova, 1968; Youngner et al., 1965; Suzuki et al., 1974; Saito et al., 1976; Suzuki et al., 1977), Bakterien und Bakterienprodukte (Gledhill, 1959; Youngner und Stinebring, 1964; Ke und Ho, 1967; Kato et al., 1975) sowie Protozoen (Rytel und Jones, 1966; Freshman et al., 1966; Huang et al., 1968; Rytel und Marsden, 1970).

Darüber hinaus existiert eine Anzahl von Substanzen, die sowohl die Lymphozyten-Blastogenese und -Proliferation stimulieren, wie auch die Bildung von Interferon induzieren. Die Existenz einer solchen Interferon-Aktivität in Kulturüberständen Mitogen-stimulierter Lymphozyten wurde erstmals von Wheelock (1965) beschrieben. Wheelock (1965) fand, daß Phytohaemagglutinin (PHA), ein Extrakt aus Phaseolus vulgaris, die Interferon-Produktion in Suspensionen von humanen Leukozyten induziert. Er führte diese Tatsache auf die Stimulierung der mitotischen Aktivität in Lymphozyten zurück, da PHA in anderen Zellkulturen kein Interferon induzieren konnte (Edelman und Wheelock, 1966).
Die Beobachtung von Wheelock führte zur Definition des Immun-Interferon, auch als Typ-II-Interferon oder heute als IFN-γ bezeichnet (Vilcek et al., 1983). IFN-γ wird von immunkompetenten lymphoiden Zellen auf einen antigenen oder mitogenen Stimulus hin produziert (Falcoff, 1972; Youngner und Salvin, 1973; Epstein et al., 1974; Epstein, 1979).
Epstein et al. (1971), die in Lymphozytenkulturen des Menschen nach PHA-Stimulierung nur niedrige Interferontiter, in Makro-

phagenkulturen dagegen keine IFN-γ-Produktion nachweisen konnten, zeigten jedoch, daß durch Kokultivierung von Lymphozyten und Makrophagen der Interferontiter um ein Vielfaches gesteigert, und die Produktion damit optimiert werden kann. Sie wiesen als IFN-γ-produzierende Zellen nach Stimulierung mit PHA T-Lymphozyten nach. Dies wurde von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Wussow et al., 1981; Chang et al., 1982).
Neben PHA wurden weitere Mitogene gefunden, die in Lymphozytenkulturen vom Menschen bzw. der Maus eine Produktion von IFN-γ, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, induzieren können. Hierzu gehören Concanavalin A, Pokeweed Mitogen, Streptolysin O und Staphylokokken-Enterotoxin A (Friedman und Cooper, 1967; Wallen et al., 1973; Stobo et al., 1974; Epstein et al., 1974; Johnson et al., 1977). Langford et al. (1978) zeigten in ihren Untersuchungen mit peripheren Lymphozyten des Menschen, daß Staph.-Enterotoxin A dreimal mehr IFN-γ induziert als PHA und ConA.

Zahlreiche Studien haben sich mit der Frage beschäftigt, welche Zelltypen nun tatsächlich in einer Lymphozytenkultur das Interferon produzieren (Wallen et al., 1973; Stobo et al., 1974). Insbesondere wurde versucht, diese Zellen mittels monoklonaler Antikörper phänotypisch, aufgrund von Oberflächenstrukturen zu charakterisieren.
Es konnte gezeigt werden, daß die Zusammensetzung der an der IFN-γ-Produktion beteiligten T-Zellpopulationen davon abhängt, ob die Lymphozyten mit polyklonal wirksamen Mitogenen oder mit Antigenen stimuliert werden. So erfordert eine Stimulierung mit Staph.-Enterotoxin A und mit PHA ein Zusammenwirken verschiedener T-Zellsubpopulationen, während die Induzierung mit ConA weniger zellspezifisch zu sein scheint (Archer et al., 1979; Marcucci et al., 1984).
Eine ConA-induzierte Bildung von IFN-γ ist bei der Maus an reife T-Lymphzyten gebunden, d.h. an Theta-Antigen tragende Milzzellen und nicht an Thymozyten (Stobo et al., 1974). Torres et al., (1982a,b) stimulierten Milzzellen der Maus mit dem T-Zell-Mitogen Staph.-Enterotoxin A. Die Autoren stellten fest, daß die so induzierte IFN-γ-Produktion durch eine Interaktion zwischen Helfer-,

Suppressor- und den eigentlichen für die IFN-γ-Produktion zuständigen T-Lymphozyten reguliert wird. Sie konnten die beteiligten Zellpopulationen phänotypisch charakterisieren.
Auch beim Menschen wird die durch Staph.-Enterotoxin A induzierte IFN-γ-Produktion durch eine Suppressor-T-Zelle reguliert (Papermaster et al., 1983). Ihre phänotypischen Eigenschaften ähneln denen jener Zellen, die in vitro die Produktion spezifischer Antikörper sowie die Immunglobulinproduktion in der autologen "mixed-lymphocyte-reaction" regeln (Morimoto et al., 1981; Gatenby et al., 1981).

Wiranowska-Stewart und Stewart (1981) zeigten beim Menschen und Olstad et al. (1981) bei der Maus, daß auch Makrophagen geringe Mengen an Immun-Interferon produzieren können.
Die IFN-γ-Produktion durch Nullzellen nach Induktion mit Protein A von Staphylokokkus aureus wurde durch Ratliff et al. (1982) nachgewiesen. Beim Menschen sind sowohl T- als auch B-Lymphozyten in der Lage, Immun-Interferon zu produzieren, wenn auch mit einer unterschiedlichen Produktionskinetik. So läßt sich B-Zell-produziertes IFN-γ später nachweisen als T-Zell-produziertes. Wie im Maus-System trägt auch in Lymphozytenkulturen des Menschen die Präsenz von Makrophagen zu einer signifikanten Erhöhung der IFN-γ-Produktion bei (Epstein et al., 1974; Epstein und Salmon, 1974; Epstein und Cline, 1974; Epstein, 1976).
Reem et al. (1982) zeigten, daß Thymozyten des Menschen nach Stimulierung mit ConA oder PHA nur geringe Mengen an IFN-γ zu synthetisieren vermögen. Die Interferon-Produktion durch die Thymozyten wurde jedoch gesteigert nach Zusatz von intakten B-lymphoblastoiden Zellen oder durch den Zusatz von konditioniertem Medium B-lymphoblastoider Zellkulturen. Eine spontane IFN-γ-Produktion durch T-lymphoblastoide Zellinien des Menschen wiesen Morris et al. (1982) nach.

Eine Interferon-Produktion durch Milzzellen nach PHA-Stimulierung ist nicht unbedingt mit einem vermehrten Thymidineinbau der stimulierten Zellen korreliert (Wietzerbin et al., 1978). Neumann und Sorg (1977) untersuchten die IFN-γ-Produktion durch Milzzellen der Maus. Wenn die Milzzellen über Glasperlen-Säulen fraktioniert wurden, nahm die Interferon-Produktion ab, während

die mitotische Antwort auf die Stimulantien drastisch zunahm. Wurden die so fraktionierten Lymphozyten weiter über Nylonwoll-Säulen gereinigt, unterblieb die Interferon-Produktion völlig, wohingegen der Thymidineinbau in den stimulierten Kulturen unverändert hoch war. Die Interferon-Synthese konnte durch Zusatz von Knochenmarks- oder Milzmakrophagen wiederhergestellt werden. Makrophagen, die aus Proteose-Pepton-induzierten Peritonealexsudaten stammten, hatten dagegen keinen Effekt. Neumann und Sorg (1977, 1978) konnten weiterhin zeigen, daß reine Makrophagenkulturen von Milzen BCG-immunisierter Mäuse ohne weitere Stimulierung Interferon produzieren. Wenn Kulturüberstände von aktivierten T-Lymphozyten, die keine Interferon-Aktivität enthielten, mit Makrophagenkulturen unterschiedlichen Ursprungs für 45 Stunden inkubiert wurden, konnte in den Überständen von Makrophagenkulturen aus Knochenmark und Milz, nicht jedoch in den Überständen von Proteose-Pepton-induzierten Peritonealmakrophagen Interferon-Aktivität nachgewiesen werden.

Die Produktion von IFN-γ durch Lymphozyten des Huhnes wurde erstmals durch Bülow et al. (1984) beschrieben, die in ConA-stimulierten Milz- und Thymuszellkulturüberständen eine derartige Aktivität nachweisen konnten.

Immun-Interferon unterscheidet sich von IFN-α und IFN-ß hinsichtlich verschiedener Merkmale. Hierzu gehören antigene und chemisch-physikalische Eigenschaften (Wheelock, 1965; Langford et al., 1979), die Membranrezeptoren (Friedman, 1979; Branca und Baglioni, 1981), über die eine Reihe von zellulären Antworten vermittelt wird (Taylor-Papadimitriou, 1980), die Kinetik der Induzierung einer Virusinterferenz (Dianzani et al., 1978), sowie die Antitumor- und immunregulatorische Aktivität (Salvin et al., 1975; Sonnenfeld et al., 1977).
IFN-γ wird durch Erwärmung auf 56°C für 60 Minuten wie auch durch eine 24-stündige Inkubation bei pH 2 oder pH 11 inaktiviert (Wheelock, 1965; Epstein, 1977; Langford et al., 1979). Es gibt jedoch auch Berichte über ein Antigen-induziertes hitzestabiles IFN-γ (Youngner und Salvin, 1973). Möglicherweise unterscheiden sich Mitogen- und Antigen-induzierte Immun-Interferone

in ihrer Hitzeresistenz.
Fischer und Rubinstein (1983) berichten über eine spontane Produktion von IFN-γ und einem säurelabilen IFN-α durch Subpopulationen mononukleärer Zellen des Menschen. Sie konnten zwar die Interferon-Aktivität durch Säurebehandlung um über 80% reduzieren, was auf das Vorhandensein von IFN-γ schließen ließ, zeigten jedoch mit Hilfe monospezifischer Antiseren, daß auch IFN-α vorlag. Die spontane Interferon-Produktion, die sie beobachteten, war jedoch nur in jenen Zellkulturen nachzuweisen, die mit einer Zelldichte von mindestens $5x10^6$ pro ml angesetzt worden waren.
IFN-γ und IFNα/ß unterscheiden sich im Hinblick auf die Kinetik der Induzierung eines antiviralen Status in Zellkulturen. Um den durch die 1-stündige Einwirkung von 100 Einheiten virusinduzierten Interferons auf humane diploide Vorhautzellen entstandenen Schutz gegenüber Virusinfektionen zu erzielen, müssen 100 Einheiten IFN-γ 24 Stunden lang einwirken. Es wird deshalb angenommen, daß die beiden Interferone den antiviralen Status über verschiedene Mechanismen induzieren (Dianzani et al., 1978).
Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der IFN-γ-Produktion durch humane Blutlymphozyten nach Staph.-Enterotoxin A-Induktion in vitro zeigten, daß der Interferontiter nach 4-5 Tagen ein Maximum erreicht und danach drastisch abnimmt (Langford et al., 1978). Diese Abnahme ist jedoch nicht durch eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen bedingt, sie läßt sich vielmehr auf eine erhöhte Aktivität von Suppressorzellen zurückführen (Papermaster et al., 1983).

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Versuchstiere

Als Zellspender dienten spezifiziert pathogenfreie (SPF) Küken. Sie wurden aus Valo-Eiern (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) erbrütet und in Isolierställen, bei konventioneller Fütterung, aufgezogen.
Die Tiere wurden im Alter von 8-12 Wochen zur Gewinnung von Thymus-, Milz- und Bursazellen, im Alter von 6 Wochen zur Gewinnung von Peritonealmakrophagen und im Alter von 1-3 Wochen für die Herstellung von Knochenmarksmakrophagen- und Kükennieren (KN)-Zellkulturen verwendet. Aus 11-tägigen Embryonen wurden Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Kulturen hergestellt.

II. Kulturmedien

1. Lymphozytenkulturmedium

Dulbeccos modifiziertes Eagles Minimum Essential Medium (DMEM, aus Pulvermedium, Gibco Europe, Nr. 041-1965) wurde mit folgenden Zusätzen verwendet:

a) 3% fötales Kälberserum (FKS), inaktiviert (60 Minuten bei 56°C)
   2% Hühnerserum (HüS), inaktiviert (60 Minuten bei 56°C)
   2,2 g/l Natrium-Bicarbonat
   110 mg/l Natrium-Pyruvat
   36 mg/l L-Asparagin
   36 mg/l L-Arginin-HCL
   6 mg/l Folsäure
   200 µg/ml Streptomycin
   200 I.E./ml Penicillin-G-Natrium

b) wie unter (a), jedoch ohne Serumzusatz.

2. Makrophagenkulturmedium

a) Knochenmarksmakrophagen

Dulbeccos modifiziertes Eagles Minimum Essential Medium (DMEM, aus Pulvermedium, Gibco Europe, Nr. 041-1965) mit 8% FKS, 2% HüS, 3,7g/l Natrium-Bicarbonat und weiteren Zusätzen, wie unter (1).

b) Peritonealmakrophagen

RPMI-Medium 1640 (aus Pulvermedium, Gibco, Nr. 074-1800) mit folgenden Zusätzen:
10% Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB, Difco Laboratories, Detroit)
8% FKS
2% HüS
200 I.E./ml Penicillin-G-Natrium
200 µg/ml Streptomycin

3. Kulturmedium für Hühnerembryofibroblasten und Kükennierenzellen

Medium 199 (aus Pulvermedium, Gibco, Nr. 071-1100) mit folgenden Zusätzen: 10% TPB, 5% FKS bzw. 10% für Nierenzellkulturen, Antibiotika wie unter (1).

4. Kulturmedium für lymphoblastoide Zellinien

RPMI-Medium 1640 (aus Pulvermedium, Gibco, Nr. 074-1800) mit 10% TPB, 10% FKS und Antibiotika wie unter (1).

5. Agarosemedium für Plaquetests

43,5% Medium 199, 2-fach konzentriert
10% TPB, 2% FKS, 1% Antibiotika in der Dosierung wie unter (1),
43,5% Agarose 1,25% in aqua dest.

6. Nährboden für Candida albicans

6,5% Sabouraud-Dextrose Agar (Oxoid),
93,5% aqua dest.

III. Lymphozytenkulturen

1. Thymus-Zellkulturen

Die Thymusläppchen von 8-12 Wochen alten Küken wurden aseptisch, unter Entfernung der Bindegewebskapseln, entnommen und mehrfach in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, pH 7,2 (PBS), gewaschen. Sie wurden anschließend in ein Nylonsieb überführt, welches in eine mit PBS gefüllte Petrischale getaucht war und mittels einer Schere sowie eines Silikonstopfens zerkleinert. Hierdurch konnten grobe Bindegewebsanteile abgetrennt werden. Das derart zerkleinerte Gewebe wurde sodann unter Verwendung von Dounce-Homogenisatoren mit losem Stempel vorsichtig homogenisiert. Weitere gröbere Gewebebestandteile ließen sich durch feine Siebe aus V2A-Stahl (Maschenweite 110µm) abscheiden.
Die so erhaltene Zellsuspension wurde nach der von Bøyum (1968) entwickelten Methode über Ficoll-Hypaque Gradienten (Ficoll-Paque^{R}, Pharmacia, Uppsala) fraktioniert.
Dazu wurden in Zentrifugenbechern aus Glas (44x100mm) 20 ml vorgekühltes (18°C) Ficoll-Hypaque mit 20 ml der Zellsuspension überschichtet und in einer Kühlzentrifuge (Minifuge, Heraeus Christ) für 30 Minuten bei 400 x g und 18°C zentrifugiert.

Danach wurde die in der Interphase befindliche Zellbande mittels einer Pasteur-Pipette abgenommen und zweimal in PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in Lymphozytenkulturmedium suspendiert.
Alternativ zu der von Bøyum entwickelten Methode wurde die Zellsuspension durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert. Die danach im Überstand suspendierten Zellen, überwiegend Lymphozyten und unterschiedlich große Mengen von Erythrozyten wurden zweimal in PBS gewaschen und schließlich ebenfalls in Kulturmedium suspendiert.
Zur Ermittlung der Anzahl lebender Zellen wurde eine kleine Probe der Zellsuspension nach Kaltenbach (1958) mit 0,05%iger Nigrosinlösung (in PBS) 1:100 verdünnt, und die ungefärbten vitalen Zellen wurden in einem Hämozytometer (Fuchs-Rosenthal) gezählt.
Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von $0{,}5 \times 10^7$, 1×10^7 bzw. 2×10^7 vitalen lymphoiden Zellen pro ml eingestellt und in Portionen von 8ml in kleinen Kunststoff-Kulturflaschen ($25 cm^2$, Falcon Nr. 3013) bzw. in 25ml in großen Kulturflaschen ($75 cm^2$, Falcon Nr. 3024F) ausgesät. Die so angesetzten Kulturen wurden bei 38°C, 41°C und 44°C in feuchter Atmosphäre mit 10% CO_2 bebrütet.

2. Milz-Zellkulturen

Milzen von 8-12 Wochen alten Küken wurden steril entnommen und nach Entfernung der Kapsel homogenisiert und aufbereitet, wie dies bereits für Thymuszellen beschrieben wurde.
Die Milzzellen wurden entweder von einzelnen Tieren gewonnen oder es wurden die Zellen mehrerer Spendertiere (4 Tiere beiderlei Geschlechts) gemischt und in einer Dichte von $0{,}5 \times 10^7$/ml, 1×10^7/ml bzw. 2×10^7/ml in Kulturmedium suspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in kleinen ($25 cm^2$) Falcon-Flaschen in Portionen von je 8ml angesetzt und bei 41°C in feuchter Atmosphäre mit 8% CO_2 bebrütet.

3. Zellkulturen aus Bursa Fabricii

Die Bursa Fabricii wurde Küken im Alter von 8-12 Wochen entnommen und von der bindegewebigen Kapsel sowie vom Zylinderepithel der Divertikelfalten befreit. Die weitere Aufbereitung des Gewebes erfolgte nach der Beschreibung, die für Thymuszellen gegeben wurde.
Die Bursazellen wurden in Dichten von $0,5x10^7$, $1x10^7$ oder $2x10^7$ Zellen pro ml in Kulturmedium suspendiert und in kleinen Kunststoff-Kulturflaschen (25 cm^2) in je 8ml angesetzt und wie die Milzzellen bebrütet.

IV. Makrophagenkulturen

1. Peritonealmakrophagen

Peritonealexsudatzellen wurden aus 6 Wochen alten Küken 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 10ml einer 10%igen sterilen Proteose-Pepton-Lösung (Oxoid) gewonnen, wie ausführlich bei Klemm (1983) beschrieben ist. Nach Entbluten und Enthäuten der Tiere wurde der geöffnete Peritonealraum mit 50ml eisgekühltem RPMI-1640 unter Zusatz von 10% Tryptosephosphat-Lösung ausgespült. Die derart gewonnene Zellsuspension wurde in einer Kühlzentrifuge für 5 Minuten bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in Kulturmedium für Peritonealmakrophagen suspendiert und auf eine Dichte von $1x10^5$/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in Portionen von je 1ml in Gewebekulturschälchen aus Polystyrol (Ø 3,5cm, Lux) gefüllt und in feuchter Atmosphäre bei 38°C und 5% CO_2 für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Schälchen dreimal mit je 10ml RPMI-1640 gespült, um die nichtadhärenten Zellen zu entfernen, sodann mit je 2ml Kulturmedium überschichtet und weiter inkubiert.

2. Knochenmarksmakrophagen

Zur Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen wurden Femur und Tibia von 1-2 Wochen alten Küken mit serumhaltigem Kulturmedium durchspült. Das Mark wurde durch Aufziehen in einer Injektionsspritze homogenisiert, auf eine Zelldichte von $4{,}2 \times 10^6$/ml eingestellt und in Polystyrol-Gewebekulturschalen (Ø 145mm, Greiner) ausgesät. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 38,5°C wurden die nicht-adhärierten Zellen in neue Kulturschalen derselben Größe überführt und für weitere 4 Tage inkubiert. Die ausgereiften adhärenten Makrophagen wurden sodann mit 0,05% Trypsin (Trypsin 1:250, Difco) und 0,02% Versen in PBS, pH 7,2, von den Kulturgefäßen abgelöst, zweimal in PBS gewaschen und in Kulturmedium als sekundäre Makrophagenkulturen wie folgt angesetzt:
Für Phagozytoseversuche 3ml mit 10^5 Zellen/ml in 60mm-Kulturschälchen (Lux) mit je zwei Deckgläsern (12x32mm) oder ohne Deckgläser; für Zytostase-Tests in Multiwell-Kulturplatten (24 Vertiefungen á $2cm^2$, Falcon, Nr. 3008), mit 2×10^5 Zellen in 1ml pro Vertiefung; für andere Versuche wurden Makrophagen auch in 60mm-Schälchen in einer Dichte von 10^5 Zellen/cm^2 angesetzt.

3. Milzmakrophagen

Milzmakrophagen wurden aus Milzzellen isoliert, welche auf die bereits beschriebene Art und Weise mittels Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert worden waren. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in serumhaltigem Kulturmedium auf eine Dichte von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt, in Portionen von je 25ml in großen Falcon-Kulturflaschen ($75cm^2$) ausgesät und bei 41°C in feuchter Atmosphäre mit 10% CO_2 für 24 Stunden bebrütet. Sodann wurden, nach Abspülen der nicht-adhärierten Zellen, die adhärierten Zellen mit 0,05% Trypsin und 0,02% Versen in PBS, pH 7,2, abgelöst, zweimal in PBS gewaschen und in der jeweils gewünschten Zelldichte in Kulturmedium suspendiert.

V. Andere Zellkulturen

1. Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Kulturen

Fibroblasten wurden von 11-tägigen Hühnerembryonen mit Hilfe von Standardmethoden durch Trypsinierung gewonnen. Dazu wurden die Embryonen nach Entfernung von Kopf und Eingeweiden mit einer Schere fein zerkleinert und in einem Erlenmeyerkolben auf einem Magnetrührer dreimal für je 30 Minuten mit 0,05% Trypsin (Trypsin 1:250, Difco) in PBS (vorgewärmt auf 39°C) behandelt. Die trypsinierten Zellen wurden durch niedertourige Zentrifugation (400 x g für 15 Minuten) sedimentiert, in Kulturmedium resuspendiert und zur Entfernung gröberer Bestandteile durch mehrfache Lagen steriler Baumwollgaze filtriert. Kulturen wurden stets mit bestimmten Zellkonzentrationen angesetzt, und zwar in 60mm-Kulturschälchen je 4,5ml mit $2x10^5$ Zellen/ml und in Mikrotiter-Kulturplatten mit flachen Böden 0,2ml mit 10^5 Zellen pro Vertiefung. Die Kulturen wurden in feuchter Atmosphäre mit 8% CO_2 bei 39°C bebrütet und bildeten innerhalb von 3 Tagen einen dichten Zellrasen.
Für Versuche zur Makrophagenaktivierung wurde der zellfreie Überstand von einzelnen 4 Tage alten konfluenten HEF-Kulturen gewonnen und nach Filtration durch Membranfilter (45µm, Sartorius) portioniert bei -70°C eingefroren.

2. Kükennieren (KN)-Kulturen

Kükennieren-Kulturen wurden, wie bei Bülow und Biggs (1975) beschrieben, hergestellt. Die Zellen für den Ansatz von KN-Kulturen wurden durch Trypsinierung von Nieren 2-3 Wochen alter SPF-Küken gewonnen und in einer Dichte von $6x10^5$ Zellen/ml in Kulturmedium in Polystyrol-Gewebekulturschalen (Ø 60mm, Lux) angesetzt; jedes Schälchen wurde mit 5ml Zellsuspension beschickt. Der Kulturüberstand drei Tage alter konfluenter Zellkulturen wurde gewonnen und portioniert bei -70°C eingefroren.

3. Lymphoblastoide Zellen

Die Marek-Tumorzellinie MDCC-RP1 wurde fortlaufend in Medium RPMI-1640 mit 10% Tryptosephosphat und 10% inaktiviertem fötalen Kälberserum kultiviert, wie von Bülow und Schmid (1979) beschrieben. Einen Tag vor Verwendung für Zytostaseversuche wurden RP1-Zellen in einer Dichte von 10^6 Zellen/ml in frischem Kulturmedium angesetzt und zur Vermehrung für 24 Stunden bei 38,5°C bebrütet.

VI. Candida albicans-Kulturen

Candida albicans, Stamm 628 (Institut Pasteur) wurde auf Sabouraud-Dextrose-Agar fortlaufend bei 32°C kultiviert. Für Phagozytoseversuche wurden Kulturen mit RPMI-1640 unter Zusatz von 10% Tryptosephosphat oder mit DMEM abgeschwemmt, auf eine Zelldichte von 10^9/ml eingestellt und unmittelbar darauf im Versuch verwendet. Hitzeinaktivierte Candidazellen wurden wie folgt gewonnen: Abgeschwemmte Hefezellen wurden in PBS für 20 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die inaktivierten Zellen im jeweiligen Kulturmedium suspendiert und nach Einstellen einer Zelldichte von 10^9/ml im Versuch eingesetzt.

VII. Anreicherung von T-Lymphozyten über Nylonfaser-Säulen

Eine Anreicherung von T-Lymphozyten aus Milzzellkulturen, die zur Entfernung von Makrophagen für 24 Stunden vorinkubiert worden waren, wurde in Anlehnung an die von Julius et al. (1973) beschriebene Methode durchgeführt.
Hierzu wurden je 2,8g Nylonwolle (9H297LO, Fenwal Laboratories, Illinois, U.S.A.) in sterile 20ml-Spritzen bis zur 12ml-Markierung gestopft, nachdem die Nylonwolle zuvor wiederholt in 0,01-molarer EDTA-Lösung aufgekocht und nach ausgiebigem Spülen in aqua bidest. autoklaviert worden war. Nach Äquilibrierung der Säulen mit warmem Lymphozytenkulturmedium wurden jeweils 4ml

der Milzzellsuspension (10^8 Zellen/ml) aufgetragen und das System für 60 Minuten bei 41°C im Brutschrank mit CO_2-Atmosphäre inkubiert. Sodann erfolgte ein Auswaschen der Säulen mit Kulturmedium, wobei das Eluat in Zentrifugenröhrchen gesammelt, danach 10 Minuten mit 400 x g bei 4°C zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in serumhaltigem Lymphozytenkulturmedium resuspendiert wurden.

VIII. Gewinnung und Untersuchung von Lymphokinen

Für die Gewinnung von Lymphokinen wurden Thymus- und Milzzellkulturen verwendet, denen zur Stimulierung der T-Lymphozyten lösliches Concanavalin A (ConA) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) in unterschiedlichen Dosierungen zugesetzt wurde. Die genauen Dosierungen werden bei den jeweiligen Ergebnissen aufgeführt.
Lymphoide Zellkulturen aus der Bursa Fabricii, die durch einen sehr hohen Anteil an B-Lymphozyten charakterisiert sind, dienten insbesondere der Kontrolle, inwieweit lösliches ConA beim Huhn auch B-Lymphozyten zu stimulieren vermag. Zellfreies Kulturmedium wurde nach Kultivierung für 24-96 Stunden gewonnen, durch Membranfilter (45µm, Sartorius) filtriert und portioniert bei -70°C eingefroren.
Die Kulturen enthielten das Phytomitogen ConA in der Regel während der gesamten Kultivierungszeit. In besonderen Fällen waren die Lymphozyten nur durch einen 3-stündigen ConA-Puls mit anschließendem Waschen vor der weiteren Bebrütung behandelt worden.
In allen Versuchen wurden gleichzeitig Kulturen unbehandelter Lymphozyten untersucht, um eine eventuelle spontane, d.h. nicht durch zugesetztes Mitogen induzierte Lymphokin-Produktion nachzuweisen.
Eine erfolgreiche Stimulierung der Lymphozyten äußerte sich meist in einer zunehmenden Säuerung des Kulturmediums, die jedoch nicht in allen Fällen mit einem gleichzeitig erhöhten Lymphokin-Gehalt verbunden war.

Für Aktivierungsversuche wurden dem Medium von Makrophagenkulturen 10% der jeweiligen Lymphokin-Präparation zugesetzt, oder es wurden Lymphokin-Verdünnungsreihen untersucht.

IX. Untersuchung zytostatischer Wirkungen kultivierter Makrophagen nach unterschiedlichen Behandlungen

Zur Untersuchung zytostatischer Wirkungen unterschiedlich behandelter kultivierter Makrophagen wurden 1 Tag alte Sekundärkulturen von Knochenmarksmakrophagen als Effektorzellen und RP1-Zellen als Targetzellen verwendet.
Von den auf ihre Wirkung zu untersuchenden Proben wurden Verdünnungsreihen in Stufen von 1:3 in Kulturmedium hergestellt und in Portionen von je o,1ml pro Verdünnungsstufe in je 4 Vertiefungen einer 24-Loch-Multiwellplatte verbracht. Dazu waren die Multiwellplatten mit $2x10^5$ sekundären Knochenmarksmakrophagen und $5x10^4$ RP1-Zellen in 0,9ml Makrophagenkulturmedium pro Vertiefung vorbereitet worden, so daß in den Kulturen ein Effektor: Targetzellverhältnis von 4:1 bestand.
Makrophagen und RP1-Zellen wurden dann für weitere 48 Stunden mit und ohne aktivierende Zusätze kokultiviert, bevor die RP1-Zellen ausgezählt wurden. Für jeden einzelnen Versuch wurden die Zellen aus den vierfach angesetzten Kulturen gesondert ausgezählt.
Als Kontrollen dienten Kulturen unbehandelter Makrophagen mit RP1-Zellen. Als weitere Kontrolle wurden RP1-Zellen ohne Makrophagen in Medium mit den gleichen Zusätzen wie zur Makrophagenaktivierung angesetzt. Damit konnte eine mögliche unmittelbare Wirkung dieser Substanzen auf die Targetzellen kontrolliert werden.
Zur Ermittlung der wachstumshemmenden Wirkung auf RP1-Zellen wurde die Vermehrung der Targetzellen in unbehandelten Makrophagenkulturen mit jener in behandelten Makrophagenkulturen verglichen, wobei die in unbehandelten Makrophagenkulturen ermittelte Zahl der RP1-Zellen als Referenz diente. Auf diese Weise konnte die Wirksamkeit der jeweils untersuchten Probe in Form ihrer 50% Zytostase-induzierenden Dosis pro ml bestimmt werden.

X. Untersuchung der Phagozytosekapazität und -aktivität kultivierter Makrophagen nach unterschiedlichen Behandlungen

Die sogenannte unspezifische, d.h. nicht immunologische Phagozytose mononukleärer Phagozyten wurde durch Erfassung der Phagozytosekapazität und der Phagozytoseaktivität unterschiedlich vorbehandelter Peritonealmakrophagen und sekundärer Knochenmarksmakrophagen quantifiziert.
Die Peritonealmakrophagen wurden über einen Zeitraum von 24-96 Stunden mit Lymphokinen, mit Überständen von Kükennierenzellkulturen oder mit Kulturüberständen von Hühnerembryofibroblasten behandelt. Bei jedem Mediumwechsel (alle 24 Stunden) wurde auch der jeweils zugesetzte Kulturüberstand (10%ig) erneuert.
Zur Durchführung der Phagozytoseversuche wurden die Makrophagenkulturen in 35mm-Schälchen dreimal mit serumfreiem Medium gespült und mit $1x10^9$ Candidazellen pro ml im gleichen Medium überschichtet. Die Phagozytosezeit betrug 30 Minuten bei 38,5°C. Danach wurden die Kulturen mit PBS gespült, 60 Minuten mit 2%igem Glutaraldehyd (Sigma) fixiert und nach Pappenheim gefärbt.
Die Bestimmung der Phagozytosekapazität in den jeweils dreifach angesetzten Kulturen erfolgte durch Auszählen der Hefezellen in je 100 zufällig ausgewählten Makrophagen und Errechnung des arithmetischen Mittelwertes. Die Phagozytosekapazität einer Makrophagenpopulation wurde in Form der mittleren Anzahl phagozytierter C.albicans pro Makrophage angegeben.
Die Phagozytoseaktivität einer Makrophagenpopulation konnte entsprechend durch die Bestimmung des Anteils jener Makrophagen bestimmt werden, die mindestens eine Hefezelle phagozytiert hatten.

Sekundäre Knochenmarksmakrophagen wurden als Deckglaskulturen analog zu den Peritonealmakrophagen für 24 bzw. 48 Stunden mit Lymphokinen und Kulturüberständen unterschiedlicher Herkunft behandelt.
Für Phagozytoseversuche wurden die Makrophagenkulturen dreimal mit serumfreiem Medium gespült und danach für 30 Minuten bei 38,5°C mit $1x10^9$ vitalen bzw. hitzeinaktivierten Candidazellen pro ml im gleichen Medium überschichtet. Danach wurden die

Kulturen mit warmem Medium gespült und nach Pappenheim gefärbt. Die Bestimmung der durchschnittlichen Phagozytosekapazität und Phagozytoseaktivität erfolgte durch die Bewertung von 100 zufällig ausgewählten Makrophagen je Deckglas und Errechnung des arithmetischen Mittelwertes analog zu den Peritonealmakrophagen.

Parallel zu den aufgeführten Versuchen wurden mit Candidazellen überschichtete Makrophagenkulturen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Hiermit konnte überprüft werden, ob unter Umständen bei der späteren Auswertung ein bloßes Anheften der Hefezellen an die Phagozytenmembran eine Phagozytose vortäuschen konnte. Eine erfolgte Phagozytose wurde darüber hinaus in Nativpräparaten mittels Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert.

Um die Phagozytosekapazität und -aktivität unbehandelter Makrophagen in Abhängigkeit von der Dichte der Zellen pro Flächeneinheit untersuchen zu können, wurden Knochenmarks- und Peritonealmakrophagen mit unterschiedlichen Zellzahlen pro mm^2 angesetzt. Genauere Angaben zur Flächendichte der Zellen werden bei den Ergebnissen gemacht. Die Durchführung und Auswertung der Phagozytoseversuche erfolgte sodann nach der beschriebenen Methode.

XI. Untersuchung von Makrophagenkulturen auf die Bildung von mehrkernigen Zellen

Um den Einfluß von Lymphokinen auf die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen zu untersuchen, wurden sekundäre Knochenmarksmakrophagen-Kulturen nach 48-stündiger Lymphokin-Behandlung (10%iger Zusatz) fixiert und nach Pappenheim gefärbt. Der Anteil mehrkerniger Zellen wurde sodann durch Auszählen von 1000 Zellen je Ansatz ermittelt.

XII. Bestimmung antiviraler Interferon-Aktivität

1. Plaquereduktionstest

Zum Nachweis von Interferon (IFN)-ähnlichen antiviral wirksamen Bestandteilen wurden sämtliche Lymphokin-Präparationen im Plaquereduktionstest (Lindenmann und Gifford, 1963) untersucht. Der Test wurde mit 4 Tage alten dichten HEF-Kulturen in 60mm-Schälchen durchgeführt. Als Testvirus diente der Stamm Indiana des vesikulären Stomatitisvirus (VSV).
Von den zu untersuchenden Proben wurden Verdünnungsreihen in Stufen von 1:3 in Kulturmedium hergestellt, die dann zum Teil auch im später beschriebenen Mikro-IFN-Test untersucht wurden. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 2ml auf jeweils drei HEF-Kulturen verbracht, von denen das alte Kulturmedium vorher abgesaugt worden war. Die zugehörigen Kontrollen wurden mit 2ml reinem Kulturmedium überschichtet. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 39°C wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturen mit 0,2ml Virusverdünnung (VSV, 50 Plaque-bildende Einheiten (PBE) pro 0,2ml) beimpft und nach einer Adsorptionszeit von 60 Minuten bei 39°C mit je 6,5ml Agarosemedium überschichtet. Die durch das Virus verursachten Plaques wurden am 2. Tag post infectionem (p.i.), nach Formalinfixierung (10%ig), Entfernung des Agarosemediums und Trocknung der Kulturen ausgezählt.
Von je drei Kulturen pro Verdünnungsstufe wurde das arithmetische Mittel der Plaquezahlen bestimmt. Der Interferontiter wurde als $\log_3$ jener Verdünnung angegeben, die eine Reduzierung der Plaquezahl um 50% gegenüber unbehandelten Kontrollen bewirkt hatte und in IFN-Einheiten pro 2ml ausgedrückt.
Um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Tests zu überprüfen, wurde in jedem Versuch eine IFN-Standardpräparation parallel zu den anderen Proben mitgeführt. Diese IFN-Präparation war in früheren Untersuchungen (Bülow et al., 1984) mit dem WHO Referenz-Hühner-Interferon (Prep. Nr. 67/18, 80 Units/ml) verglichen worden, so daß die ermittelten IFN-Einheiten auch als internationale Einheiten (I.E.) angegeben werden konnten.

2. Mikro-Interferon-Test

Zahlreiche Lymphokin-Präparationen wurden parallel zum Plaquereduktionstest auch mit Hilfe eines Mikro-Interferon-Tests untersucht. Dieser Test basiert auf den Arbeiten von Tilles und Finnland (1968), Finter (1969) und Armstrong (1971). Er wurde mit HEF-Kulturen in Mikrotiterplatten mit Flachboden durchgeführt, nachdem sich ein dichter Zellrasen entwickelt hatte. Die Auswertung erfolgte photometrisch. Auch im Mikro-IFN-Test diente VSV als Testvirus. Die Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Proben wurden vom gleichzeitig durchgeführten Plaquereduktionstest übernommen, um die Einheitlichkeit des Untersuchungsmaterials im Hinblick auf einen späteren Vergleich der Ergebnisse aus beiden Tests zu gewährleisten.
Von jeder Verdünnungsstufe der zu untersuchenden Probe wurden 0.1ml in je vier Vertiefungen der Mikrotiterplatte verbracht, nachdem das zuvor vorhandene Kulturmedium auf sterilen Zellstofflagen ausgeklopft worden war. Den Kontrollen (Zellkontrolle und Viruskontrolle) wurde je 0,1ml reines Kulturmedium zugesetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 39°C wurden die Zellkulturen, unter Ausnahme der Zellkontrollen, mit je 0,1ml einer in Kulturmedium angesetzten Virusverdünnung (125 PBE) beimpft. Die Zellkontrollen erhielten einen Zusatz von 0,1ml reinem Kulturmedium je Vertiefung.
Der Grad der durch das Virus verursachten Zellzerstörung wurde nach Inkubation der Mikrotiterplatten für weitere 48 Stunden ermittelt. Hierzu wurden die Zellkulturen nach Dekantieren der Kulturüberstände für 15 Minuten mit einer Färbe-Fixier-Lösung (0,5% Methylviolett, 5% Formalin(v/v), 50% Ethanol (v/v), 0,85% NaCl und 43,65% aqua dest.) behandelt, anschließend gründlich mit Leitungswasser gespült und getrocknet. Der durch die nicht zerstörten Zellen aufgenommene Farbstoff konnte dann durch 30-minütige Einwirkung von 0,2ml 2-Methoxyethanol (Merck) je Vertiefung in Lösung gebracht werden.
Die quantitative Auswertung des Mikro-IFN-Tests wurde mit Hilfe des Microelisa-Auto-Reader MR 580 von Dynatech durchgeführt. Die Extinktionswerte, die mit diesem Gerät ermittelt werden

können, liegen innerhalb eines Meßbereiches von o-1,5. Die Messung erfolgte simultan bei zwei Wellenlängen:
Testwellenlänge = 570nm, Referenzwellenlänge = 404nm.
Als Interferontiter wurde diejenige Verdünnungsstufe der untersuchten Probe angegeben, die 50% der Zellen vor einer Zerstörung durch das Virus schützen konnte, d.h. der Interferontiter ergab sich aus dem photometrischen Meßwert für eine 50%ige Zellzerstörung im Vergleich zu den intakten Kontrollkulturen und den Viruskontrollen:
Extinktionswert bei 50% geschützten Zellen = (Extinktionswert der Zellkontrolle + Extinktionswert der Viruskontrolle) x 0,5.
Die so ermittelten IFN-Werte wurden als I.E. pro 0,1ml angegeben.
Eine IFN-Standardpräparation wurde in jedem Versuch parallel zu den eigentlichen Proben untersucht, wie bereits beim Plaquereduktionstest besprochen.

XIII. Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften von Lymphokin-Präparationen oder Interferonen

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lymphokin-Präparationen oder Interferone wurden wie folgt untersucht:
Zur Messung der pH-Stabilität wurde der pH-Wert der zu untersuchenden Probe durch Zusatz ausreichender Mengen von 1N HCl bei 0°C auf pH 2 erniedrigt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 4°C wurde der pH-Wert der Probe durch Zusatz 1N NaOH wieder auf 7,0 eingestellt. Kontrollproben wurde anstatt HCl und NaOH das entsprechende Volumen an PBS zugesetzt.

Die Wärmestabilität wurde durch Erhitzen der Proben auf 56°C für 60 Minuten geprüft, während die Kontrollen bei 4°C gelagert wurden.

Um die Trypsinempfindlichkeit zu testen, wurde den Proben Trypsin (40 units/mg, Serva) in Form einer Stammlösung zugesetzt, bis eine Konzentration von 100µg/ml erreicht war. Die zu untersuchenden Proben wurden gemeinsam mit den Kontrollproben für 2 Stunden

bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde den entsprechenden Proben ein Trypsininhibitor (Soybean trypsin inhibitor, 35 units/ml, Serva) zugesetzt, bis wiederum eine Endkonzentration von 100µg/ml erreicht war.

D. ERGEBNISSE

I. Gewinnung von Lymphokinen aus Lymphozytenkulturen des Huhnes

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse von Versuchen zur Lymphokin-Gewinnung aus Lymphozytenkulturen des Huhnes konzentrieren sich auf zwei Lymphokine, die aus der Vielzahl möglicher Lymphokin-Aktivitäten zur näheren Untersuchung ausgewählt wurden, nämlich den Makrophagen-aktivierenden Faktor (MAF) und das Gamma-Interferon (IFN-γ). Zum Nachweis dieser beiden Lymphokine wurde zellfreies Medium unterschiedlich aufbereiteter und unter verschiedenen Bedingungen kultivierter Thymus-, Milz- und Bursazellen untersucht, wobei jeweils die Optimierung und Standardisierung der Lymphokin-Gewinnung im Vordergrund der Experimente standen. Beide Lymphokine wurden zunächst aufgrund ihrer biologischen Effekte in Zellkulturen charakterisiert.
Dabei diente die Induzierung zytostatischer Eigenschaften kultivierter Knochenmarksmakrophagen durch Behandlung mit derartigen Lymphokin-Präparationen zum qualitativen Nachweis des Makrophagen-aktivierenden Faktors. Dieser wurde in Form der pro ml Kulturmedium gemessenen 50% Zytostase-induzierenden Einheiten quantitativ erfaßt. Die in den Lymphokin-Präparationen enthaltene antivirale Interferon-Aktivität wurde mit Hilfe des Plaquereduktionstests bzw. eines Mikro-IFN-Tests mit vesikulärem Stomatitisvirus (VSV) in Hühnerembryofibroblasten(HEF)-Kulturen nachgewiesen und in IFN-Einheiten pro 2ml bzw. pro 0,1ml Kulturmedium angegeben.
Die zur Gewinnung von Lymphokinen aus Thymus, Milz und Bursa Fabricii angelegten Zellkulturen bestanden regelmäßig zu über 90% aus lymphoiden Zellen, wie durch mikroskopische Beurteilung von nach Pappenheim gefärbten Zellausstrichen festgestellt wurde. Sie werden daher im folgenden vereinfacht auch als Lymphozytenkulturen angesprochen.

1. Lymphokin-Produktion durch kultivierte Thymuslymphozyten

Der Lymphokingehalt zellfreien Mediums kultivierter Thymuslymphozyten war sowohl von der Art der Zell-Aufbereitung als auch von den anschließenden Kultivierungsbedingungen abhängig. Dabei war die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit der Lymphokin-Präparationen (50% Zytostase-induzierende Dosis) immer eng mit ihrer antiviralen Aktivität (IFN-Einheiten) verbunden. Lymphokine, die zytostatische Eigenschaften kultivierter Knochenmarksmakrophagen zu induzieren vermochten bzw. Interferon-ähnliche Wirkungen besaßen, konnten jedoch ausschließlich in Kulturüberständen ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen nachgewiesen werden. Zellfreies Medium unbehandelter kultivierter Thymuslymphozyten enthielt keine der beiden genannten biologischen Aktivitäten.
Demgegenüber ließ sich allerdings durch eine Behandlung mit Kulturüberständen sowohl unstimulierter als auch ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen das Phagozytoseverhalten kultivierter Peritonealmakrophagen gegenüber vitalen C.albicans beeinflussen. Die Ergebnisse der in diesem Zusammenhang durchgeführten Phagozytoseversuche werden jedoch erst später in Kapitel II der Ergebnisse ausführlich dargestellt.
In den Versuchen zur Optimierung der Lymphokin-Produktion wurden ausschließlich die Zytostase-induzierende- sowie die antivirale Aktivität als Kriterien zur Erfassung der biologischen Wirksamkeit von Thymuszellkulturüberständen herangezogen.
Der Lymphokingehalt zellfreien Mediums kultivierter, ConA-stimulierter Thymuslymphozyten war bei konstanter ConA-Dosis (30µg pro ml) und einer konstanten Zellzahl ($2x10^7$ Zellen pro ml) von der Kultivierungsdauer (Abbildung 1) sowie von der Kultivierungstemperatur (Abbildungen 2 und 3) der Thymuszellen abhängig.
Die höchsten Zytostase-induzierenden und antiviralen Aktivitäten konnten in Kulturüberständen ConA-stimulierter Thymuslymphozyten gemessen werden, die für 72 Stunden bei 41°C in serumhaltigem Medium (3% FKS, 2% HüS) inkubiert worden waren. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 1 und Tabelle 1 im einzelnen dargestellt.

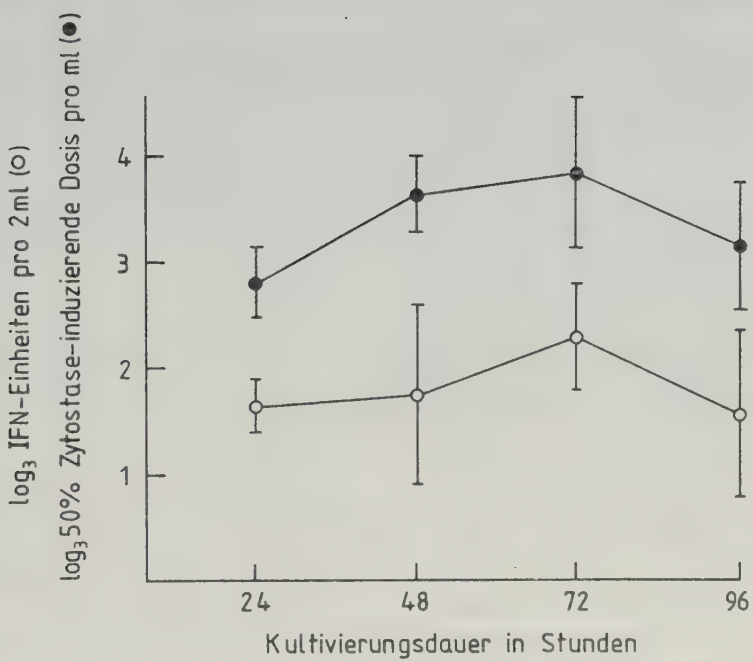

Abbildung 1

Lymphokin-Produktion in Thymuszellkulturen: Abhängigkeit der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit (●—) und antiviralen Aktivität (○—) zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen (30µg ConA pro ml, $2x10^7$ Zellen pro ml) von der Kultivierungsdauer der Zellen. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung. Die in diesen Versuchen verwendeten Lymphozytenkulturen waren zuvor aus Thymuszellsuspensionen über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert worden. Die Kultivierung der Thymuslymphozyten erfolgte in serumhaltigem Medium (3% FKS, 2% HüS) bei 41°C.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit und antiviralen Aktivität zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen (30µg ConA pro ml, $2x10^7$ Zellen pro ml) von der Kultivierungstemperatur und Kultivierungsdauer. Die in diesen Versuchen verwendeten Lymphozytenkulturen waren zuvor aus Thymuszellsuspensionen über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert worden. Die Kultivierung der Thymuslymphozyten erfolgte in serumhaltigem Medium (3% FKS, 2% HüS).

Kultivierungsdauer	Kultivierungstemperatur	ZID[1] $\log_3$ pro ml	IFN-Einheiten[2] $\log_3$ pro 2ml
24 Stunden	38°C	2,74 ± 0,25	0,91 ± 0,10
	41°C	2,77 ± 0,36	1,66 ± 0,23
	44°C	1,05 ± 0,38	0
48 Stunden	38°C	3,40 ± 0,43	1,30 ± 0,61
	41°C	3,65 ± 0,35	1,74 ± 0,83
	44°C	1,65 ± 0,39	0
72 Stunden	38°C	3,73 ± 0,27	1,81 ± 0,93
	41°C	3,85 ± 0,68	2,32 ± 0,51
	44°C	1,95 ± 0,13	0,32 ± 0,10
96 Stunden	38°C	n.d.[3]	n.d.
	41°C	3,15 ± 0,61	1,56 ± 0,81
	44°C	n.d.	n.d.

1) ZID = 50% Zytostase-induzierende Dosis

2) IFN-Einheiten = Interferon-Einheiten

Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung angegeben.

3) n.d. = nicht durchgeführt

Wurde jeweils für Teile desselben Zellkulturansatzes eine niedrigere Temperatur, wie man sie physiologischerweise im Bereich der Körperoberfläche des Huhnes findet oder ein für das Huhn unphysiologisch hoher Wärmegrad als Inkubationstemperatur gewählt, nämlich 38°C bzw. 44°C, so enthielten die nach 24, 48 oder 72 Stunden gewonnenen Kulturüberstände in allen Fällen deutlich niedrigere Makrophagen-aktivierende sowie antivirale Aktivitäten als die entsprechenden 41°C-Überstände. Diese Befunde sind in den Abbildungen 2 und 3 graphisch dargestellt. Auch nach einer auf 96 Stunden verlängerten Inkubationsdauer von Teilen der oben beschriebenen Zellkulturansätze konnte im Medium der Lymphozytenkulturen, die bei 41°C bebrütet worden waren im Vergleich zu 72-Stunden-Überständen kein höherer Lymphokingehalt gemessen werden (Abbildung 1). Vielmehr verringerte sich die Lymphokinausbeute in allen Versuchen um über 50% gegenüber den 72-Stunden-Werten, während die antivirale Aktivität der Überstände nach 96 Stunden um etwa 80% niedriger lag als nach 72 Stunden (Tabelle 1).

Die in den bisher beschriebenen Untersuchungen verwendeten Lymphozytenkulturen waren zuvor aus Thymuszellsuspensionen über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert worden (siehe Material und Methoden). Die Kultivierung der Thymuslymphozyten erfolgte in serumhaltigem Medium.

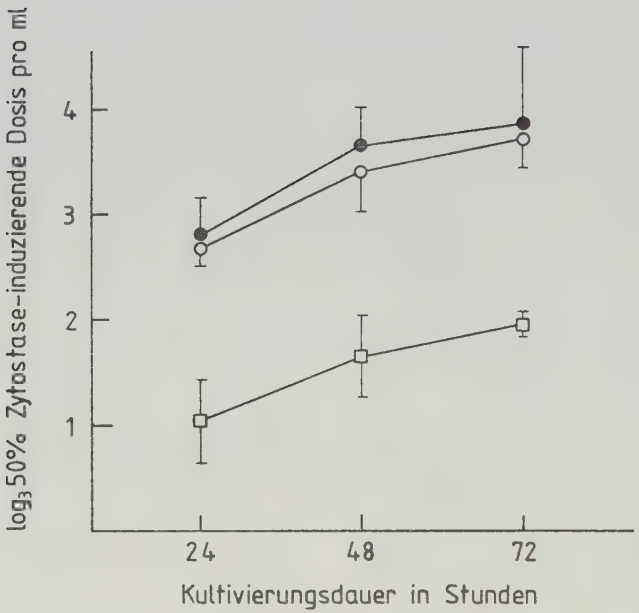

Abbildung 2

Lymphokin-Produktion in Thymuszellkulturen: Abhängigkeit der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen (30µg ConA pro ml, $2x10^7$ Zellen pro ml) von der Kultivierungsdauer und Kultivierungstemperatur. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung. Die in diesen Versuchen verwendeten Lymphozytenkulturen waren zuvor aus Thymuszellsuspensionen über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert worden. Die Kultivierung der Thymuslymphozyten erfolgte in serumhaltigem Medium (3% FKS, 2% HüS) bei 38°C (○), 41°C (●) und 44°C (□).

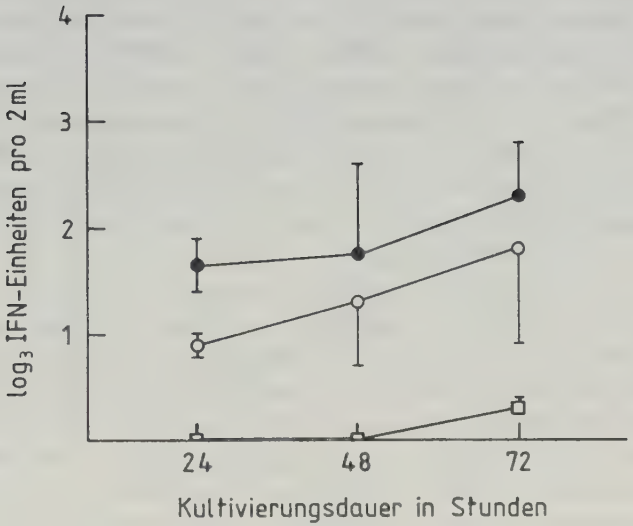

Abbildung 3

Interferon-Produktion in Thymuszellkulturen: Abhängigkeit der antiviralen Aktivität zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen (30µg ConA pro ml, $2x10^7$ Zellen pro ml) von der Kultivierungsdauer und Kultivierungstemperatur. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung. Die in diesen Versuchen verwendeten Lymphozytenkulturen waren zuvor aus Thymuszellsuspensionen über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert worden. Die Kultivierung der Thymuslymphozyten erfolgte in serumhaltigem Medium (3% FKS, 2% HüS) bei 38°C (○), 41°C (●) und 44°C (□).

Um festzustellen, welche Abhängigkeit zwischen der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit von Überständen ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen und der Art der Gewinnung sowie von verschiedenen Bedingungen bei der Kultivierung der Lymphozyten besteht, wurden folgende Experimente durchgeführt. Thymuslymphozyten, die aus dem Thymusgewebe jeweils eines Tieres parallel mit und ohne Ficoll-Hypaque-Gradienten (siehe Material und Methoden) fraktioniert worden waren, wurden mit und ohne Serumzusatz bei konstanter Zellzahl ($2x10^7$ Zellen pro ml) sowie mit unterschiedlichen ConA-Dosierungen (0-60µg ConA pro ml) für 72 Stunden bei 41°C bebrütet.

Wie die in Abbildung 4 graphisch dargestellten Ergebnisse dieser Versuche zeigen, besaß das zellfreie Medium der Lymphozytenkulturen immer dann die durchschnittlich höchste Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit, wenn die Lymphozyten mit 30µg ConA pro ml Kulturmedium stimuliert worden waren. Niedrigere oder höhere ConA-Dosierungen hatten eine deutlich geringere Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit der Kulturüberstände zur Folge. Unerwarteterweise war in allen Zellkulturansätzen die zur Induzierung einer maximalen Lymphokin-Produktion erforderliche ConA-Dosis sowohl von der Art der Lymphozytengewinnung unabhängig als auch davon, ob die Thymuslymphozyten in serumhaltigem oder serumfreiem Kulturmedium inkubiert wurden. Bei einer konstanten ConA-Dosis von 30µg ConA pro ml Medium wurden jedoch unterschiedlich hohe Lymphokingehalte in den Zellkulturüberständen gemessen, je nachdem auf welche Art die Lymphozyten gewonnen und anschließend inkubiert worden waren.

Eine Fraktionierung von Lymphozyten aus Thymuszellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g (siehe Material und Methoden) und die anschließende Bebrütung der so gewonnenen Lymphozyten in serumhaltigem Medium führte zu den durchschnittlich höchsten Lymphokin-Konzentrationen in den Kulturüberständen. Wurden die Lymphozyten dagegen über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert und anschließend in serumfreiem Kulturmedium inkubiert, so war die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit der Überstände vergleichsweise am niedrigsten (Abbildung 4).

Die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

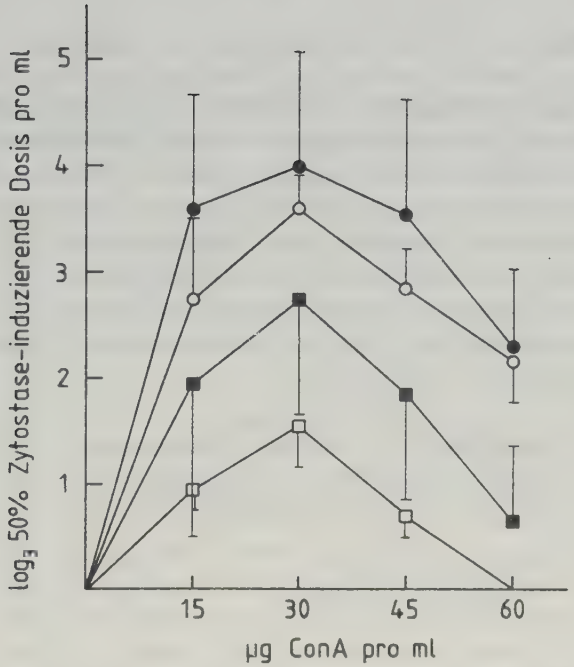

Abbildung 4

Lymphokin-Produktion in Thymuszellkulturen: Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der ConA-Dosis sowie in Abhängigkeit von verschiedenen Arten der Gewinnung und Kultivierung der Zellen. Die Lymphozyten wurden bei einer Zellzahl von $2x10^7$ Zellen pro ml für 72 Stunden bei 41°C bebrütet. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung. Die Lymphozyten wurden aus Thymuszellsuspensionen entweder durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und anschließend in serumhaltigem (●) oder serumfreiem (■) Medium inkubiert bzw. sie wurden über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert und in serumhaltigem (○) oder serumfreiem (□) Medium inkubiert (siehe auch Tabelle 2).

Tabelle 2

Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der ConA-Dosis sowie von verschiedenen Arten der Gewinnung und Kultivierung der Zellen. Die Lymphozyten wurden aus Thymuszellsuspensionen entweder durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g oder über Ficoll-Hypaque-Gradienten fraktioniert und anschließend in serumhaltigem oder serumfreiem Medium bei einer Zelldichte von $2x10^7$ Zellen pro ml für 72 Stunden bei 41°C bebrütet.

Gewinnung/Kultivierung der Lymphozyten	ConA-Dosis µg pro ml	ZID[1] $\log_3$ pro ml
3 Minuten 30 x g/ serumfreies Medium	0	0
	15	1,97 ± 1,50
	30	2,75 ± 1,30
	45	1,87 ± 1,07
	60	0,68 ± 0,65
3 Minuten 30 x g/ serumhaltiges Medium	0	0
	15	3,60 ± 1,05
	30	4,00 ± 1,05
	45	3,53 ± 1,06
	60	2,30 ± 0,72
Ficoll-Hypaque-Gradient/ serumfreies Medium	0	0
	15	1,07 ± 0,21
	30	1,77 ± 0,38
	45	0,80 ± 0,20
	60	0
Ficoll-Hypaque-Gradient/ serumhaltiges Medium	0	0
	15	2,73 ± 0,80
	30	3,60 ± 0,26
	45	2,83 ± 0,35
	60	2,17 ± 0,40

1) ZID = 50% Zytostase-induzierende Dosis; angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

Die bisher dargestellten Versuchsergebnisse beschreiben die Abhängigkeit der Lymphokin-Produktion durch kultivierte, ConA-stimulierte Thymuslymphozyten von verschiedenen Arten der Lymphozytengewinnung und -kultivierung bei einer jeweils konstanten Zellzahl von $2x10^7$ Zellen pro ml. Den Resultaten sind gleichzeitig die Bedingungen für eine optimale Lymphokin-Produktion, ausgedrückt als 50% Zytostase-induzierende Dosis pro ml Kulturmedium, zu entnehmen. Durch eine Kultivierung der Thymuslymphozyten bei anderen Zelldichten konnte die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit der entsprechenden Kulturüberstände im Vergleich zu den vorher dargestellten Ergebnissen nicht weiter verbessert werden (Abbildung 5 und Tabelle 3).

Die höchsten Lymphokin-Aktivitäten pro ml Kulturmedium ließen sich somit in den Überständen kultivierter Thymuslymphozyten erzielen, wenn diese aus Thymuszellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und sodann nach Stimulierung mit 30µg ConA pro ml Medium für 72 Stunden bei 41°C und in einer Konzentration von $2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium bebrütet worden waren. Unter diesen Bedingungen konnten in den Kulturüberständen auch die höchsten antiviralen Aktivitäten gemessen werden, die jedoch mit 17 IFN-Einheiten ($2{,}57 \log_3 \pm 0{,}63$) pro 2ml Kulturüberstand vergleichsweise niedrig waren.

Allerdings reichte bereits ein 5%iger Zusatz autologer Milzzellen zu den ConA-stimulierten Thymuszellkulturen aus, um die Lymphokin-Produktion unter optimalen Bedingungen um das etwa 10-fache zu steigern. Eine dem 5%igen Zusatz entsprechende Anzahl für sich allein inkubierter Milzzellen produzierte vergleichsweise geringe Lymphokin-Mengen.

In allen bisher beschriebenen Versuchen verblieb das den Zellkulturen zugesetzte ConA während der gesamten Inkubationsdauer im Kulturmedium, da nach einer Puls-Behandlung der Thymuslymphozyten mit entsprechenden ConA-Dosen, bei der das zugesetzte ConA nach einer 3-stündigen Einwirkungsdauer wieder ausgewaschen wurde, keine oder nur sehr geringe Lymphokin-Aktivitäten in den Überständen gemessen werden konnten. Dafür wurden dann den unbehandelten Kontrollkulturen am Ende der Inkubationszeit jeweils die den ConA-stimulierten Kulturen entsprechenden ConA-Dosen zugesetzt. Die in den untersuchten Kulturüberständen vorhandenen ConA-Konzentrationen hatten keinerlei Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

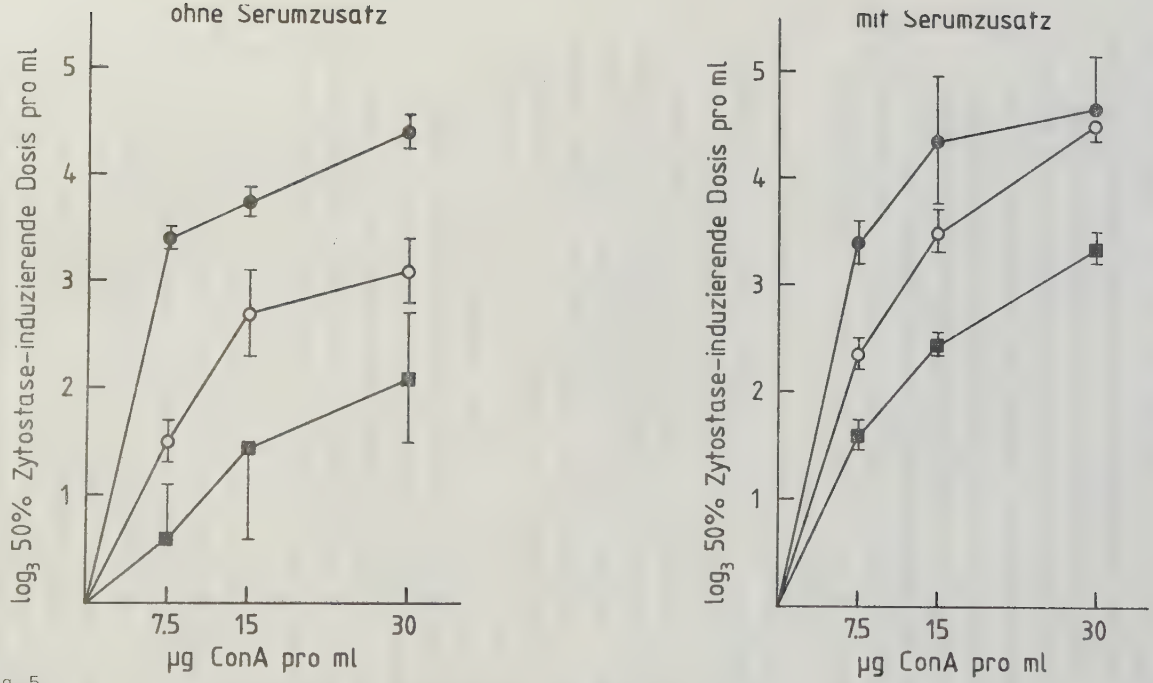

Abbildung 5

Lymphokin-Produktion in Thymuszellkulturen: Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozyten in Abhängigkeit von der ConA-Dosis und der Zellzahl pro ml. Die Thymuslymphozyten wurden bei Zelldichten von $0{,}5 \times 10^7$ (■), 1×10^7 (○) und 2×10^7 (●) Zellen pro ml in serumhaltigem bzw. serumfreiem Medium für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung. Die in diesen Versuchen verwendeten Lymphozytenkulturen waren zuvor aus Thymuszellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert worden.

Tabelle 3

Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit zellfreien Mediums ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der Kultivierung der Zellen bei unterschiedlichen Zelldichten in serumhaltigem oder serumfreiem Medium (vgl. Abb. 5).

Kultivierung der Lymphozyten in	Zellen pro ml	ConA-Dosis µg pro ml	ZID[1] $\log_3$ pro ml
serumfreiem Medium	$0{,}5 \times 10^7$	0	0
		7,5	0,60 ± 0,55
		15	1,45 ± 0,85
		30	2,12 ± 0,62
	1×10^7	0	0
		7,5	1,51 ± 0,21
		15	2,68 ± 0,39
		30	3,07 ± 0,27
	2×10^7	0	0
		7,5	3,40 ± 0,10
		15	3,75 ± 0,05
		30	4,39 ± 0,14
serumhaltigem Medium	$0{,}5 \times 10^7$	0	0
		7,5	1,62 ± 0,08
		15	2,43 ± 0,04
		30	3,36 ± 0,06
	1×10^7	0	0
		7,5	2,35 ± 0,05
		15	3,48 ± 0,18
		30	4,50 ± 0,10
	2×10^7	0	0
		7.5	3,38 ± 0,19
		15	4,34 ± 0,56
		30	4,65 ± 0,48

1) ZID= 50% Zytostase-induzierende Dosis; angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

2. Lymphokin-Produktion durch kultivierte Milzlymphozyten

Die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und die antivirale Aktivität zellfreien Mediums kultivierter Milzlymphozyten waren von verschiedenen Behandlungen und Kultivierungsbedingungen der Zellen abhängig. Dabei unterschieden sich allerdings die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Versuche zum Teil erheblich von den bereits dargestellten Resultaten entsprechender, mit Thymuslymphozyten durchgeführter Experimente. So konnten Lymphokine, die zytostatische Eigenschaften kultivierter Knochenmarksmakrophagen zu induzieren vermochten bzw. antivirale Wirkungen besaßen, nicht nur in Überständen ConA-stimulierter Milzlymphozytenkulturen nachgewiesen werden, sondern unter bestimmten Umständen auch in zellfreiem Medium unbehandelter kultivierter Milzzellen. Die Kulturüberstände nicht-stimulierter Milzlymphozyten enthielten jedoch nur dann die beiden genannten biologischen Aktivitäten, wenn die Lymphozyten in einer Dichte von $1x10^7$ bzw. $2x10^7$ Zellen pro ml kultiviert worden waren. Wurden die unbehandelten Lymphozyten in einer Dichte von $0,5x10^7$ Zellen pro ml inkubiert, so besaß deren Kulturüberstand nach 3 Tagen weder Makrophagen-aktivierende noch antivirale Aktivitäten (Abbildungen 6 und 7).

In den bisher dargestellten Versuchen, wie auch in den weiteren mit Milzlymphozyten durchgeführten Versuchen, wurden die Zellkulturen jeweils für 72 Stunden bei 41°C inkubiert, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß die Lymphokinausbeute durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 96 Stunden nicht weiter verbessert werden konnte.

Das Vorhandensein von Serum in den Zellkulturansätzen war nicht für die Lymphokin-Produktion als solche von Bedeutung, sondern nur für die Höhe des später im zellfreien Medium unbehandelter kultivierter Milzlymphozyten gemessenen Lymphokingehaltes. Innerhalb der ConA-stimulierten Milzzellkulturen erhöhte sich durch einen Serumzusatz nur die für eine optimale Lymphokin-Produktion erforderliche ConA-Dosis, wobei ähnlich wie bei den Thymuszellen eine Abhängigkeit zur gewählten Zelldichte bestand.

Serumfreies Medium ConA-stimulierter Milzlymphozyten besaß bei einer Zelldichte von $0,5x10^7$ Zellen pro ml die höchste Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität, wenn die Lymphozyten mit 2,5µg ConA pro ml stimuliert worden waren. Bei $1x10^7$ Zellen pro ml waren in serumfreiem Kulturmedium 7,5µg ConA pro ml und bei $2x10^7$ Zellen 15µg ConA pro ml für eine maximale Lymphokin-Produktion erforderlich. In Abbildung 6 sind diese Befunde graphisch dargestellt.
Wurden die Zellen in serumhaltigem Medium inkubiert, so konnten in den Kulturüberständen ConA-stimulierter Lymphozyten, unabhängig von der Zelldichte, die höchsten Lymphokin-Aktivitäten gemessen werden, wenn die Zellen mit 45µg ConA pro ml stimuliert worden waren (Abbildung 7). Dabei war, wie ebenfalls der Darstellung in Abbildung 7 zu entnehmen ist, der durchschnittliche Lymphokingehalt in den Kulturüberständen jener Lymphozytenkulturen am höchsten, die mit einer Dichte von $0,5x10^7$ Zellen pro ml angesetzt worden waren. Die Einzelwerte dieser Versuche sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt.
Wie bei den Thymuslymphozyten, so war auch bei den Milzlymphozyten die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit der Lymphokin-Präparationen immer eng mit ihrer antiviralen Aktivität verbunden. Die Dosis-Wirkungskurven, die nach verschiedenen ConA-Dosierungen aufgrund der in den Kulturüberständen stimulierter Milzlymphozyten gemessenen Makrophagen-aktivierenden und antiviralen Aktivität erstellt wurden, verliefen annähernd parallel. Dabei lagen die Interferon (IFN)-Titer immer deutlich unterhalb der Zytostase-induzierenden (ZID)-Titer (Abbildungen 6 und 7). Andere Resultate ergaben sich bei der Untersuchung von Kulturüberständen unstimulierter Milzlymphozyten. Hier waren die durchschnittlichen Titer der beiden genannten biologischen Aktivitäten annähernd gleich oder die IFN-Titer lagen sogar oberhalb der ZID-Titer (Abbildung 7).

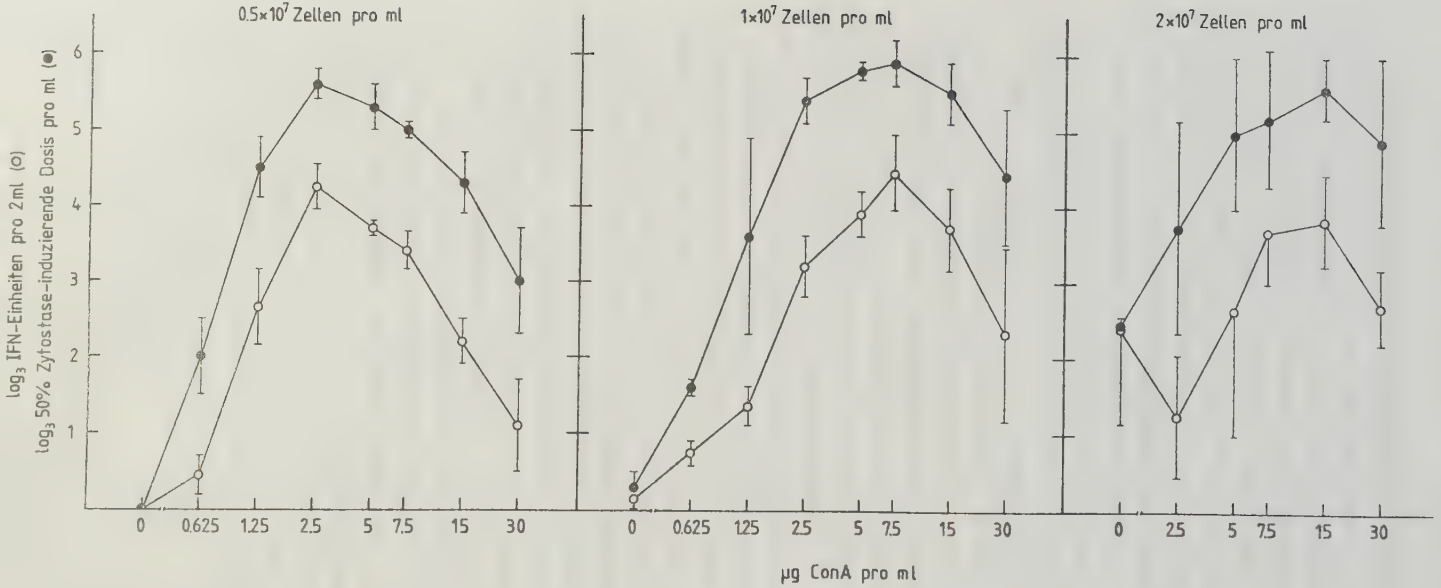

Abbildung 6

Lymphokin-Produktion in Milzzellkulturen: Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit (●——) und antivirale Aktivität (o——) zellfreien Mediums unstimulierter und ConA-stimulierter Milzlymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der ConA-Dosis sowie von der Zelldichte. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und anschließend bei 41°C für 72 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert worden. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

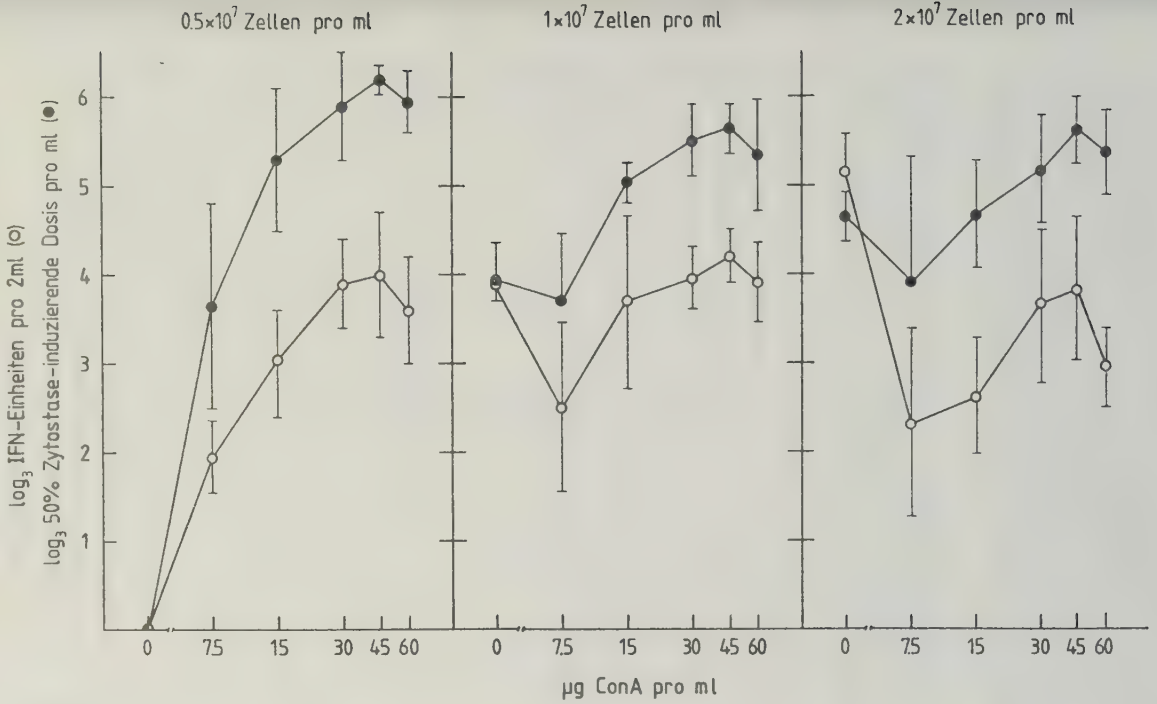

Abbildung 7

Lymphokin-Produktion in Milzzellkulturen: Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit (●——) und antivirale Aktivität (○——) zellfreien Mediums unstimulierter und ConA-stimulierter Milzlymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der ConA-Dosis sowie von der Zelldichte. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und anschließend bei 41°C für 72 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert worden. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

Tabelle 4

Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität zellfreien Mediums unstimulierter und ConA-stimulierter Milzlymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der ConA-Dosis sowie von der Zelldichte. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und anschließend bei 41°C für 72 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert worden (vergleiche Abbildung 6).

Zellen pro ml	ConA-Dosis µg pro ml	ZID[1] $\log_3$ pro ml	IFN-Einheiten[2] $\log_3$ pro 2ml
$0{,}5 \times 10^7$	0	0	0
	0,625	2,03 ± 0,51	0,45 ± 0,24
	1,25	4,47 ± 0,35	2,65 ± 0,49
	2,5	5,55 ± 0,24	4,23 ± 0,32
	5	5,28 ± 0,31	3,69 ± 0,10
	7,5	4,98 ± 0,05	3,40 ± 0,26
	15	4,30 ± 0,36	2,20 ± 0,28
	30	2,97 ± 0,67	1,08 ± 0,61
1×10^7	0	0,30 ± 0,20	0,24 ± 0,14
	0,625	1,60 ± 0,14	0,73 ± 0,13
	1,25	3,60 ± 1,24	1,36 ± 0,23
	2,5	5,38 ± 0,29	3,21 ± 0,42
	5	5,80 ± 0,14	3,91 ± 0,32
	7,5	5,86 ± 0,27	4,43 ± 0,51
	15	5,50 ± 0,36	3,70 ± 0,53
	30	4,43 ± 0,91	2,30 ± 1,13
2×10^7	0	2,45 ± 0,07	2,42 ± 1,25
	2,5	3,77 ± 1,40	1,25 ± 0,78
	5	4,97 ± 1,02	2,65 ± 1,63
	7,5	5,18 ± 0,92	3,70 ± 0,70
	15	5,55 ± 0,42	3,83 ± 0,60
	30	4,88 ± 1,12	2,70 ± 0,52

1) ZID= 50% Zytostase-induzierende Dosis

2) IFN-Einheiten= Interferon-Einheiten

Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung angegeben.

Tabelle 5

Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität zellfreien Mediums unstimulierter und ConA-stimulierter Milzlymphozytenkulturen in Abhängigkeit von der ConA-Dosis sowie von der Zelldichte. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und anschließend bei 41°C für 72 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert worden (vergleiche Abbildung 7).

Zellen pro ml	ConA-Dosis µg pro ml	ZID[1] $\log_3$ pro ml	IFN-Einheiten[2] $\log_3$ pro 2ml
$0{,}5 \times 10^7$	0	0	0
	7,5	3,67 ± 1,15	1,97 ± 0,42
	15	5,30 ± 0,82	3,07 ± 0,60
	30	5,90 ± 0,61	3,90 ± 0,50
	45	6,20 ± 0,14	4,07 ± 0,71
	60	5,95 ± 0,35	3,60 ± 0,85
1×10^7	0	3,88 ± 0,39	3,90 ± 0,17
	7,5	3,70 ± 0,75	2,50 ± 0,95
	15	5,07 ± 0,21	3,70 ± 0,95
	30	5,50 ± 0,38	3,95 ± 0,35
	45	5,63 ± 0,25	4,20 ± 0,30
	60	5,37 ± 0,61	3,88 ± 0,43
2×10^7	0	4,67 ± 0,25	5,14 ± 0,39
	7,5	3,13 ± 1,39	2,31 ± 1,07
	15	4,63 ± 0,61	2,60 ± 0,66
	30	5,15 ± 0,61	3,67 ± 0,88
	45	5,60 ± 0,36	3,80 ± 0,80
	60	5,33 ± 0,47	2,93 ± 0,45

1) ZID= 50% Zytostase-induzierende Dosis

2) IFN-Einheiten= Interferon-Einheiten

Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung angegeben.

Die unerwartet hohen Zytostase-induzierenden- und antiviralen Aktivitäten von Kulturüberständen unstimulierter Milzlymphozyten gaben Anlaß zu der Vermutung, daß es sich hierbei um den Ausdruck einer allogenen Stimulierung handeln könnte, zumal in den beschriebenen Versuchen mit Mischkulturen von Milzlymphozyten mehrerer Spender-Tiere gearbeitet worden war.
Zur Klärung dieser Frage wurden Milzzellen von 4 verschiedenen Spender-Tieren sowohl getrennt nach Tieren als auch in Mischkulturen mit gleichen Zellanteilen eines jeden Tieres bebrütet. Die Lymphozyten wurden bei einer Zelldichte von $2x10^7$ Zellen pro ml für 72 Stunden bei 41°C in serumhaltigem Medium inkubiert, da unter diesen Kulturbedingungen die höchsten Lymphokin-Konzentrationen in den Kulturüberständen unstimulierter Milzlymphozyten gemessen worden waren (Abbildung 7).
Wie in Abbildung 8 graphisch dargestellt ist, besaß das zellfreie Medium der Mischkulturen aus gleichen Zellanteilen aller 4 Spender-Tiere die weitaus höchste Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität, verglichen mit den Zellkulturüberständen der nach Tieren getrennt gehaltenen Einzelkulturen. Gleichwohl handelte es sich bei den hohen Lymphokin-Titern offenbar nur zum Teil um den Ausdruck einer allogenen Stimulierung, da auch in den Überständen der Einzelkulturen Lymphokin-Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Die Werte schwankten jedoch von Tier zu Tier erheblich. Sie sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.
Wurden entsprechende Versuche mit ConA-stimulierten (7,5µg ConA pro ml) Milzlymphozyten bei einer Zellzahl von $1x10^7$ Zellen pro ml in serumfreiem Medium durchgeführt, so ergaben sich keine Hinweise, die auf eine allogene Stimulierung der Lymphozyten in den Mischkulturen schließen ließen. Die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und die antivirale Aktivität, die in den Kulturüberständen der Mischkulturen gemessen wurden, entsprachen in ihrer Höhe den durchschnittlich in den Einzelkulturen gemessenen Aktivitäten (Abbildung 9 und Tabelle 7).

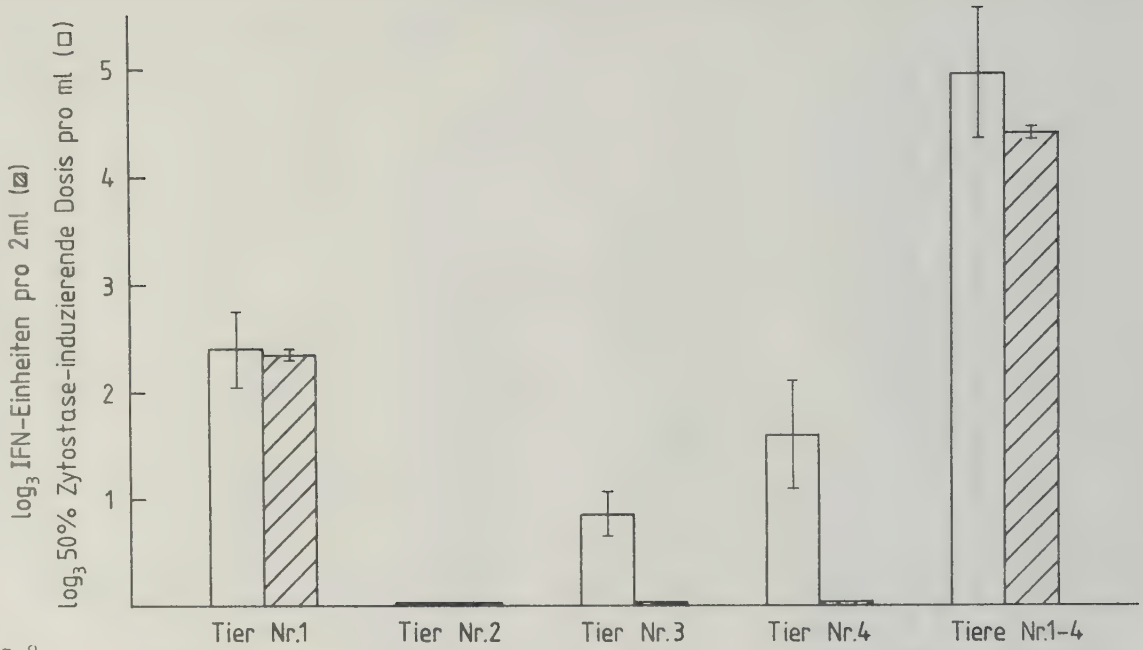

Abbildung 8

Lymphokin-Produktion in Milzzellkulturen: Vergleich der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit und antiviralen Aktivität zellfreien Mediums unstimulierter Milzlymphozytenkulturen, die als Einzelkulturen, getrennt nach Zellspendern und als Mischkulturen, mit gleichen Zellanteilen eines jeden Zellspenders für 72 Stunden bei 41°C und einer Zellzahl von $2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium inkubiert worden waren. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert worden.

Tabelle 6

Vergleich der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit und antiviralen Aktivität zellfreien Mediums unstimulierter Milzlymphozytenkulturen, die als Einzelkulturen, getrennt nach Zellspendern und als Mischkulturen, mit gleichen Zellanteilen eines jeden Zellspenders für 72 Stunden bei 41°C und einer Zellzahl von $2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium inkubiert worden waren. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Herkunft der Milzlymphozyten	ZID[1] $\log_3$ pro ml	IFN-Einheiten[2] $\log_3$ pro 2ml
Tier Nr. 1	2,39 ± 0,33	2,34 ± 0,06
Tier Nr. 2	0	0
Tier Nr. 3	0,83 ± 0,21	0
Tier Nr. 4	1,62 ± 0,49	0
Tiere Nr.1-4	4,94 ± 0,59	4,37 ± 0,06

1) ZID = 50% Zytostase-induzierende Dosis

2) IFN-Einheiten = Interferon-Einheiten

Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen zur ZID- und IFN-Bestimmung.

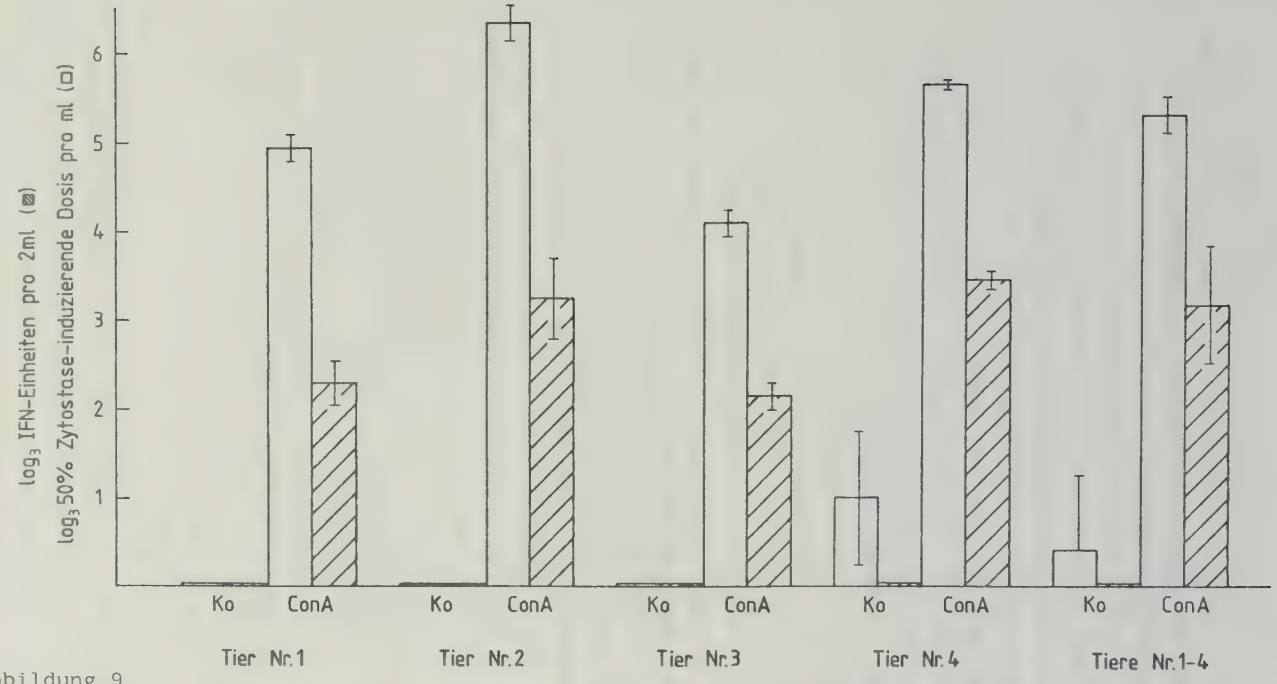

Abbildung 9

Lymphokin-Produktion in Milzzellkulturen: Vergleich der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit und antiviralen Aktivität zellfreien Mediums unstimulierter bzw. ConA-stimulierter (7,5µg ConA pro ml) Milzlymphozytenkulturen, die als Einzelkulturen, getrennt nach Zellspendern und als Mischkulturen, mit gleichen Zellanteilen eines jeden Zellspenders für 72 Stunden bei 41°C und einer Zellzahl von $1x10^7$ Zellen pro ml in serumfreiem Medium inkubiert worden waren. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert worden.

Tabelle 7

Vergleich der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit und antiviralen Aktivität zellfreien Mediums unstimulierter bzw. ConA-stimulierter (7,5µg ConA pro ml) Milzlymphozytenkulturen, die als Einzelkulturen, getrennt nach Zellspendern und als Mischkulturen, mit gleichen Zellanteilen eines jeden Spender-Tieres für 72 Stunden bei 41°C und einer Zellzahl von $1x10^7$ Zellen pro ml in serumfreiem Medium inkubiert worden waren. Die Milzlymphozyten waren zuvor aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

Herkunft der Milzlymphozyten	Behandlung der Milzlymphozyten	ZID[1] $\log_3$ pro ml	IFN-Einheiten[2] $\log_3$ pro 2ml
Tier Nr. 1	unbehandelt	0	0
	ConA-stimuliert	2,83 ± 0,16	2,30 ± 0,24
Tier Nr. 2	unbehandelt	0	0
	ConA-stimuliert	4,25 ± 0,18	3,24 ± 0,44
Tier Nr. 3	unbehandelt	0	0
	ConA-stimuliert	2,01 ± 0,16	2,13 ± 0,16
Tier Nr. 4	unbehandelt	1,01 ± 0,76	0
	ConA-stimuliert	3,56 ± 0,06	3,43 ± 0,11
Tiere Nr.1-4	unbehandelt	0,42 ± 0,84	0
	ConA-stimuliert	3,20 ± 0,19	3,13 ± 0,66

1) ZID = 50% Zytostase-induzierende Dosis

2) IFN-Einheiten = Interferon-Einheiten

Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen zur ZID- und IFN-Bestimmung ± Standardabweichung.

In weiterführenden Untersuchungen interessierte nun die Frage, welche Bedeutung sogenannte adhärente Zellen, insbesondere Makrophagen, als akzessorische Zellen für die Lymphokin-Produktion durch kultivierte, ConA-stimulierte Milzlymphozyten haben. Hierzu wurden zunächst unstimulierte Milzzellsuspensionen ($2x10^7$ Zellen pro ml) jeweils eines Zellspenders für 24 Stunden bei 41°C in Gewebekulturflaschen bebrütet, um Milzmakrophagen, die nach dieser Zeit fest am Boden der Kulturgefäße hafteten, von nicht adhärierten Zellen abtrennen zu können. Die nicht adhärierten Zellen, die sich durch vorsichtiges Aufschütteln in Suspension bringen ließen, wurden anschließend nacheinander über Ficoll-Hypaque-Gradienten und über Nylonfaser-Säulen fraktioniert (siehe Material und Methoden). Die so gewonnenen lymphoiden Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Kulturmedium sowohl unbehandelt als auch mit ConA-Zusatz (30µg ConA pro ml) für weitere 72 Stunden bei 41°C inkubiert. Einem Teil der so angesetzten Zellkulturen wurden die zuvor durch Trypsinierung vom Boden der Kulturgefäße abgelösten Milzmakrophagen in einem Anteil von 5% der Gesamtzellzahl zugefügt. Nach einer Standardmethode aufbereitete Milzzellen (siehe Material und Methoden) eines jeden Zellspenders wurden nach 24-stündiger Vorinkubation und Wechsel des Kulturmediums ohne ConA-Zusatz sowie mit ConA-Zusatz (30µg ConA pro ml) für weitere 72 Stunden bebrütet und dienten als Kontrollkulturen.

Wurde das zellfreie Medium der so angesetzten Zellkulturen auf seine Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität untersucht, so ergaben sich je nach Zellkulturansatz unterschiedliche Ergebnisse, wie in Abbildung 10 und Tabelle 8 gezeigt wird. In den Überständen der ConA-stimulierten Milzlymphozytenkulturen, die frei von sogenannten adhärenten Begleitzellen waren, konnte keine der beiden genannten biologischen Aktivitäten nachgewiesen werden, ebenso wenig wie im Medium unstimulierter Lymphozytenkulturen. Wenn den gereinigten Lymphozytenkulturen jedoch vor der ConA-Stimulierung 5% autologe Milzmakrophagen zugesetzt wurden, so konnten in den Kulturüberständen der Lymphozytenkulturen wieder ebenso hohe Makrophagen-aktivierende und antivirale Aktivitäten gemessen werden, wie in den

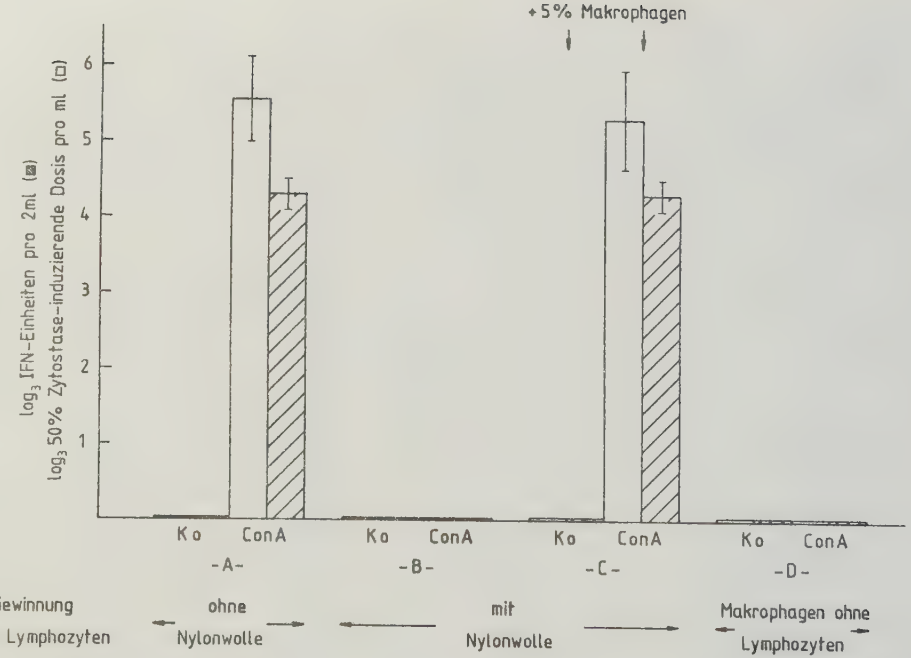

Abbildung 10

Lymphokin-Produktion in Milzzellkulturen: Bedeutung der Anwesenheit von Milzmakrophagen in ConA-stimulierten Milzlymphozytenkulturen für die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität des aus solchen Kulturen gewonnenen zellfreien Mediums. Die Lymphozyten waren entweder nach einer Standardmethode präpariert worden (A) oder sie waren über Ficoll-Hypaque-Gradienten und Nylonfaser-Säulen fraktioniert worden (B und C), wobei den Lymphozyten nach der Fraktionierung zum Teil 5% autologe Milzmakrophagen zugesetzt wurden (C). Allein inkubierte Milzmakrophagen dienten als zusätzliche Kontrolle (D). Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

Tabelle 8:

Bedeutung der Anwesenheit von Milzmakrophagen in ConA-stimulierten Milzlymphozytenkulturen für die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität des aus solchen Kulturen gewonnenen zellfreien Mediums.

Art der Zell-kultur	Gewinnung der Lymphozyten	Behandlung der Zellen	ZID[1] $\log_3$ pro ml	IFN-Einheiten[2] $\log_3$ pro 2ml
Lymphozyten	Standard-methoden	unbehandelt	0	0
		30µg ConA/ml	5,53 ± 0,56	4,30 ± 0,22
Lymphozyten	Ficoll-Hypaque Gradienten/ Nylonfaser-Säulen	unbehandelt	0	0
		30µg ConA/ml	0	0
Lymphozyten + 5% Milz-makrophagen	Ficoll-Hypaque Gradienten/ Nylonfaser-Säulen	unbehandelt	0	0
		30µg ConA/ml	5,32 ± 0,63	4,28 ± 0,18
Milzmakrophagen	-	unbehandelt	0	0
		30µg ConA/ml	0	0

1) ZID = 50% Zytostase-induzierende Dosis

2) IFN-Einheiten = Interferon-Einheiten

Angegeben sind jeweils Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standard-abweichung.

Überständen der ConA-stimulierten Kontrollkulturen.
Zur Kontrolle für sich alleine kultivierte adhärente Milzmakrophagen vermochten weder mit noch ohne ConA-Zusatz eine der beiden genannten biologischen Aktivitäten in das Kulturmedium abzugeben (siehe Abbildung 10 und Tabelle 8).

Wie die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, konnten die beiden Lymphokine Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF) und Gamma-Interferon (IFN-γ), abhängig von verschiedenen Parametern, in unterschiedlich hohen Konzentrationen in zellfreiem Medium kultivierter Thymus- oder Milzlymphozyten nachgewiesen werden. Dabei war die antivirale Aktivität der Lymphokin-Präparationen meist deutlich niedriger als deren Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit. Diese scheinbar niedrigen IFN-Titer, die zudem noch in IFN-Einheiten pro 2ml ausgedrückt wurden, sind jedoch durch den Plaquereduktionstest als Methode zur Interferon-Bestimmung bedingt. In den mit Hilfe eines Mikro-IFN-Tests parallel zum Plaquereduktionstest durchgeführten Interferon-Bestimmungen konnten in den untersuchten Kulturüberständen durchweg höhere antivirale Aktivitäten (ausgedrückt in IFN-Einheiten pro 0,1ml) gemessen werden als im Plaquereduktionstest.
Somit besaßen 0,1ml eines Lymphokin-haltigen Kulturüberstandes, im Mikro-IFN-Test gemessen, eine höhere antivirale Aktivität als 2ml desselben Kulturüberstandes, wenn sie im Plaquereduktionstest auf ihre antivirale Aktivität untersucht wurden.
Wurden Kulturüberstände ConA-stimulierter (7,5µg ConA pro ml) Milzlymphozyten eines Zellspenders, nach einer 72-stündigen Inkubationsdauer bei 41°C in serumfreiem Medium, mit den beiden genannten Methoden in drei Versuchswiederholungen parallel auf ihre antivirale Aktivität untersucht, so wurde im Mikro-IFN-Test ein IFN-Titer von 4,00 $\log_3 \pm 0{,}32$ IFN-Einheiten pro 0,1ml Medium gemessen. Im Plaquereduktionstest wurde dagegen ein Titer von nur 2,46 $\log_3 \pm 0{,}16$ IFN-Einheiten pro 2ml Medium ermittelt.
Die Untersuchung einer zweiten Lymphokin-Präparation, bei der Milzlymphozyten mehrerer Spender-Tiere gemischt und ebenfalls

unter den oben genannten Bedingungen inkubiert wurden, ergab im Mikro-IFN-Test einen IFN-Titer von 3,52 $\log_3 \pm 0{,}30$ IFN-Einheiten pro 0,1ml Medium gegenüber 2,12 $\log_3 \pm 0{,}61$ IFN-Einheiten pro 2ml im Plaquereduktionstest.
Da jedoch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Lymphokin-haltigen Kulturüberstände nur zum Teil mit Hilfe des Mikro-IFN-Tests auf ihre antivirale Aktivität untersucht worden waren, wurde auf eine Angabe der mit dieser Methode ermittelten IFN-Titer verzichtet. Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden stattdessen alle IFN-Titer in IFN-Einheiten pro 2ml angegeben.

Zusammenfassend läßt sich zur Lymphokin-Gewinnung aus Thymus- bzw. Milzlymphozytenkulturen feststellen: Während in Überständen kultivierter Thymuslymphozyten ausschließlich nach ConA-Stimulierung Lymphokin-Aktivitäten gemessen wurden, gaben kultivierte Milzlymphozyten unter bestimmten Bedingungen ($1\text{-}2\text{x}10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium) auch ohne vorherige ConA-Stimulierung Lymphokine in das Kulturmedium ab. Die vergleichsweise höchsten Lymphokin-Gehalte wurden jedoch im Medium jener Lymphozytenkulturen gemessen, die nach Zusatz einer jeweils optimalen ConA-Dosis für 72 Stunden bei 41°C bebrütet worden waren.
Für Thymuslymphozyten betrug die optimale ConA-Dosis 30µg pro ml Medium, unabhängig vom Serumgehalt und von der Zelldichte der Kulturen. Demgegenüber besaß serumfreies Medium ConA-stimulierter Milzlymphozyten, abhängig von der Zelldichte der Kulturen, die höchsten Lymphokin-Aktivitäten, wenn die Lymphozyten in einer Dichte von $0{,}5\text{x}10^7$ Zellen pro ml mit 2,5µg ConA pro ml stimuliert worden waren; bei $1\text{x}10^7$ Zellen pro ml waren in serumfreiem Kulturmedium 7,5µg ConA pro ml und bei $2\text{x}10^7$ Zellen 15µg ConA für eine maximale Lymphokin-Produktion erforderlich.
Wurden die Milzzellen dagegen in serumhaltigem Medium inkubiert, so betrug die für eine jeweils maximale Lymphokin-Produktion erforderliche ConA-Dosis, nun wiederum unabhängig von der Zelldichte der Kulturen 45µg ConA pro ml.
Im Hinblick auf eine Optimierung der Lymphokin-Produktion und bezogen auf die Art der Zellaufbereitung wurden nach einer Fraktionierung der Lymphozyten aus Thymus- bzw. Milzzellsuspensionen

durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g die höchsten Lymphokingehalte in den Kulturüberständen gemessen.
Unter den als optimal gefundenen Bedingungen für eine Lymphokin-Gewinnung betrug in den abgetrennten Zellpräparationen der Anteil akzessorischer Begleitzellen, zu denen neben Makrophagen auch dendritische Zellen, Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten zählen, ca. 5%. Nach einer völligen Entfernung der akzessorischen Zellen aus den Lymphozytenpräparationen konnten in den Kulturüberständen unstimulierter wie auch ConA-stimulierter Milzlymphozyten keine Lymphokin-Aktivitäten mehr nachgewiesen werden.

Die antivirale Aktivität (IFN-Einheiten) und die Zytostase-induzierende Aktivität (ZID-Einheiten) ungereinigter Milz-Lymphokin-Präparationen waren eng miteinander verbunden. Beide Lymphokin-Aktivitäten waren säure-, hitze- und trypsinempfindlich. Jedoch ging ihre biologische Wirksamkeit durch derartige chemisch-physikalische Behandlungen nicht vollständig verloren. Die Makrophagen-aktivierende und antivirale Aktivität wurde vielmehr in unterschiedlich hohem Maße reduziert, je nachdem unter welchen Bedingungen die untersuchten Lymphokine gewonnen worden waren. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Untersuchungen. Es wäre danach denkbar, daß die untersuchten Präparationen neben IFN-γ auch unterschiedlich hohe Anteile von säure- und hitzestabilem IFN-α oder IFN-β enthielten.

3. Lymphokin-Produktion durch kultivierte Bursalymphozyten

In Kulturüberständen unbehandelter wie auch ConA-stimulierter (7,5µg, 15µg oder 30µg ConA pro ml) Bursalymphozyten konnten weder Makrophagen-aktivierende noch antivirale Aktivitäten gemessen werden, nachdem die Zellkulturen für 72 Stunden in serumhaltigem bzw. serumfreiem Medium bei Zelldichten von $0{,}5 \times 10^7$, 1×10^7 oder 2×10^7 Zellen pro ml bei 41°C inkubiert worden waren.

Tabelle 9

Chemisch-physikalische Charakterisierung verschiedener Milz-Lymphokin-Präparationen, zu deren Gewinnung Milzlymphozyten für 72 Stunden bei 41°C inkubiert worden waren.

Kultivierungsbedingungen der Lymphozyten	Behandlung der Kulturüberstände	Antivirale Aktivität		MAF-Aktivität[1]	
		IFN-Einh.[2] $\log_3$/2ml	Reduzierung	ZID[3] $\log_3$/ml	Reduzierung
$1x10^7$ Zellen/ml 7,5µg ConA/ml serumfreies Medium Zellen von einem Zellspender	Kontrolle	3,39		4,83	
	pH 2	1,03	-92,52%	3,68	-71,73%
	Kontrolle	3,64		4,67	
	56°C	1,19	-93,22%	3,96	-54,16%
	Kontrolle	4,03		4,57	
	Trypsin	2,30	-85,06%	2,61	-88,34%
$2x10^7$ Zellen/ml ohne ConA serumhaltiges Medium Mischkultur der Zellen von vier Spender-Tieren	Kontrolle	5,25		4,02	
	pH 2	4,77	-40,98%	2,10	-87,86%
	Kontrolle	5,44		3,91	
	56°C	4,79	-51,04%	2,47	-79,45%
	Kontrolle	5,43		3,58	
	Trypsin	1,75	-98,24%	1,86	-84,88%
$2x10^7$ Zellen/ml 45µg ConA/ml serumhaltiges Medium Mischkultur der Zellen von vier Spender-Tieren	Kontrolle	6,56		6,15	
	pH 2	5,68	-61,97%	4,74	-78,76%
	Kontrolle	6,30		6,09	
	56°C	5,25	-68,45	4,99	-74,61%
	Kontrolle	6,27		6,35	
	Trypsin	3,65	-94,38%	4,79	-81,98%

1) MAF-Aktivität = Makrophagen-aktivierende Aktivität

2) IFN-Einh. = Interferon-Einheiten

3) ZID = 50% Zytostase-induzierende Dosis

II. Resultate von Versuchen zur Aktivierung kultivierter Makrophagen

Die im folgenden dargestellten Resultate beziehen sich im wesentlichen auf zwei Aspekte der Makrophagen-Aktivierung. Neben morphologischen Merkmalen Lymphokin-aktivierter Makrophagen werden vor allem Veränderungen ihres Phagozytoseverhaltens gegenüber vitalen und hitzeinaktivierten Hefezellen (C.albicans) beschrieben. Eine Darstellung der zytostatischen Wirkungen Lymphokin-aktivierter Makrophagen, die in Form der 50% Zytostase-induzierenden Dosis (ZID) zur Quantifizierung der biologischen Aktivität von Lymphokin-Präparationen genutzt wurden, findet sich dagegen bereits in Kapitel I der Ergebnisse.

1. Morphologische Veränderungen der Makrophagen nach Lymphokin-Behandlung

Eine Behandlung mit Lymphokinen führte bei in vitro ausgereiften, fünf Tage alten Knochenmarksmakrophagen innerhalb von 24 Stunden zu auffallenden morphologischen Veränderungen, deren Ausprägung unter anderem von der Dichte der Zellkulturen, d.h. von der Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit abhängig war. Bei Zelldichten bis zu 125 Zellen pro mm^2 erschienen nach einem 10%igen Lymphokin-Zusatz nahezu alle Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen deutlich vergrößert. Die aktivierten Makrophagen stellten sich hierbei überwiegend als rundliche, unregelmäßig begrenzte Zellen dar, die auf dem Boden der Kulturgefäße deutlich flach ausgebreitet waren. Die gleichzeitig im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachtende Erhöhung der Anzahl und der Größe zytoplasmatischer Vakuolen war am auffälligsten, wenn das Makrophagenkulturmedium 5% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS) bzw. eine Kombination aus 3% FKS und 2% hitzeinaktiviertem Hühnerserum (HüS) enthielt.

Bei einem alleinigen Zusatz von 5% HüS zum Kulturmedium zeigten die Lymphokin-behandelten Zellen zwar eine deutliche Größenzunahme gegenüber den unbehandelten Kontrollen, unterschieden sich von diesen bezüglich der Vakuolisierung jedoch nur geringgradig.

Ab dem 3.Tag nach der Lymphokin-Behandlung nahmen die im Vergleich zu den Kontrollen beobachteten morphologischen Veränderungen wieder ab, da nun auch die unbehandelten Zellen mit ihrem oft exzentrisch gelegenen Kern, der nicht selten von einer an kleinen Vakuolen reichen Zone umgeben war, eine deutliche Vergrößerung des Zytoplasmasaums zeigten.
Bei Zelldichten über 375 Makrophagen pro mm^2 war das mikroskopische Bild der Lymphokin-behandelten Kulturen überwiegend von langgestreckten verzweigten Zellen bestimmt. Auch hier unterschieden sich aktivierte Makrophagen von unbehandelten Kontrollen durch eine deutliche Größenzunahme, d.h. durch eine verstärkte flächenhafte Ausbreitung und durch eine Erhöhung der Anzahl und Größe zytoplasmatischer Vakuolen.
Im Unterschied zu den Kulturen mit einer Zelldichte unter 125 Zellen pro mm^2 enthielten bei Zelldichten über 375 Makrophagen pro mm^2 schon die unbehandelten Kontrollkulturen einen hohen Anteil langgestreckter, verzweigter Zellen. Somit war der morphologische Ausdruck aktivierender Einflüsse auf die Knochenmarksmakrophagen in hohem Maße von der Dichte der angesetzten Zellkulturen abhängig.

Ähnliche morphologische Veränderungen konnten auch bei Peritonealmakrophagen nach Lymphokin-Behandlung und in Abhängigkeit von der Flächendichte der Zellen beobachtet werden. So hatten die behandelten Makrophagen nach einer 72- bis 96-stündigen Kultivierungszeit ihre Größe gegenüber unbehandelten Kontrollen annähernd vervierfacht. Dabei drückte sich die Größenzunahme der Zellen in einer deutlichen Verbreiterung des im Lichtmikroskop strukturarm erscheinenden Zytoplasmasaums aus.
In Kulturen von Peritonealmakrophagen oder Knochenmarksmakrophagen mit bis zu 125 Zellen pro mm^2 war ab dem 3.Tag nach Beginn der Lymphokin-Behandlung und bei einer Zelldichte über 375 Zellen pro mm^2 bereits ab dem 2.Tag nach Behandlungsbeginn eine

zunehmend starke Säuerung des Mediums zu beobachten.

2. Vorkommen von mehrkernigen Zellen in Makrophagenkulturen

Mehrkernige Riesenzellen traten in unbehandelten Kulturen 7 Tage alter, in vitro ausgereifter Knochenmarksmakrophagen mit 125 adhärenten Zellen pro mm^2 nur sehr vereinzelt, mit einem durchschnittlichen Anteil von 0,45% auf. Wurde aber den Makrophagenkulturen am 5. Kultivierungstag ein Milzzell-Lymphokin zugesetzt (10%iger Zusatz), so erhöhte sich der Anteil mehrkerniger Riesenzellen bis zum 7.Tag der Kultivierung auf durchschnittlich 22% (Abbildung 11).

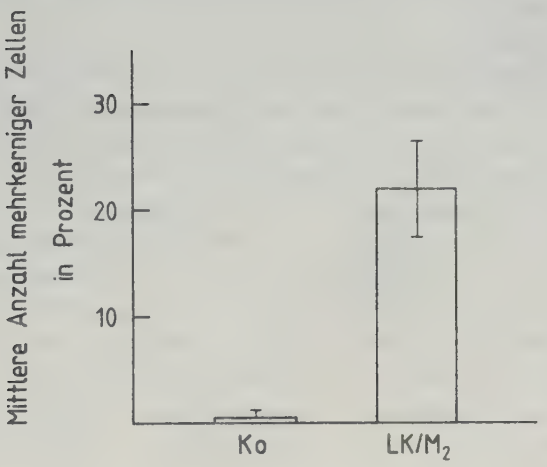

Abbildung 11

Anteil mehrkerniger Knochenmarksmakrophagen nach 48-stündiger Behandlung mit einem aus Milzzellen gewonnenen Lymphokin. Die Lymphokin-Präparation LK/M_2 wurde aus Kulturen unstimulierter Milzzellen gewonnen, die in einer Dichte von $2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Kulturmedium für 72 Stunden bei 41°C inkubiert worden waren.
Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Versuchswiederholungen $\pm$ Standardabweichung.

3. Abhängigkeit der Phagozytosekapazität und Phagozytoseaktivität kultivierter Makrophagen von der Zellzahl pro Flächeneinheit

Die Phagozytosekapazität unbehandelter Peritonealmakrophagen (Abbildung 12) war ebenso wie deren Phagozytoseaktivität (Abbildung 13) bei konstanter Kultivierungsdauer von der Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit abhängig.
Wurden den Makrophagen nach einer 48-stündigen Kultivierungsdauer vitale Candida albicans zur Phagozytose angeboten, so betrug die mittlere Anzahl phagozytierter C.albicans bei einer Dichte von 125 Zellen pro mm^2 1,09 $\pm$ 0,21 Candida-Partikel pro Makrophage. Die durchschnittliche Phagozytosekapazität der Zellen erhöhte sich auf 3,13 $\pm$ 0,20 Candida-Partikel pro Makrophage bei einer Flächendichte von 250 Zellen pro mm^2 und betrug bei 375 Zellen pro mm^2 5,07 $\pm$ 0,20 phagozytierte C.albicans pro Makrophage.
Wurde die durchschnittliche Phagozytosekapazität nicht auf die Gesamtzahl der ausgezählten Makrophagen bezogen, sondern wurde sie stattdessen auf den Anteil der phagozytoseaktiven Zellen an der Makrophagenpopulation bezogen, so erhöhte sich zwar der jeweils für die Phagozytosekapazität ermittelte Wert; die Abhängigkeit von der Flächendichte der Zellen blieb jedoch erhalten. Die mittlere Anzahl phagozytierter C.albicans betrug, bezogen auf die tatsächlich phagozytierenden Zellen, bei einer Dichte von 125 Zellen pro mm^2 2,25 $\pm$ 0,39 Candida-Partikel pro Makrophage, wobei 50,50% $\pm$ 7,55 der Zellen phagozytierten.
Bei einer Zellzahl von 250 Zellen pro mm^2 phagozytierten 82,67% $\pm$ 5,13 der Makrophagen durchschnittlich 3,79 $\pm$ 0,04 vitale C.albicans. Betrug die Zelldichte 375 Makrophagen pro mm^2, so erhöhte sich die Phagozytoseaktivität auf 94,75% $\pm$ 1,26 bei einer mittleren Phagozytosekapazität der tatsächlich phagozytierenden Zellen von 5,45 $\pm$ 0,18 Candida-Partikel pro Makrophage. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 graphisch dargestellt.

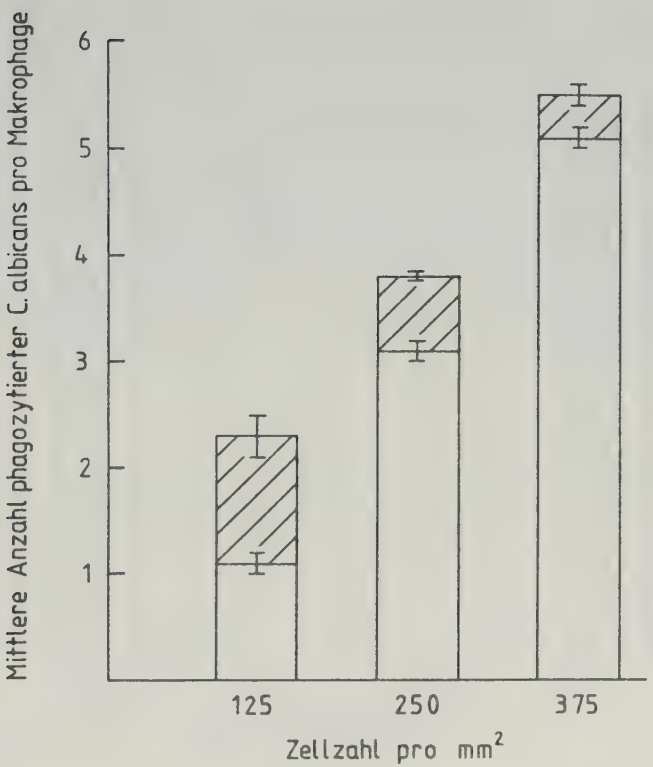

Abbildung 12

Phagozytosekapazität 48 Stunden kultivierter Peritonealmakrophagen in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Flächeneinheit. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen lebende Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.
Weiße Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der gesamten Makrophagenpopulation; schraffierte Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der phagozytierenden Makrophagen.

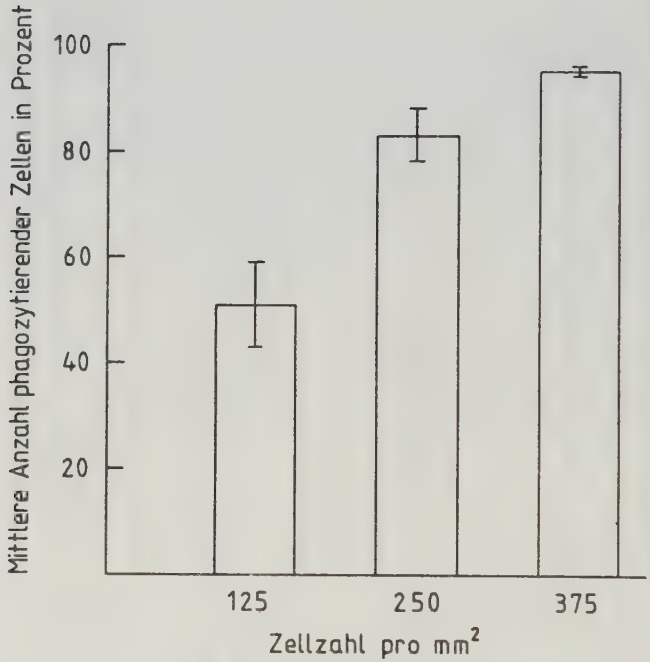

Abbildung 13

Phagozytoseaktivität 48 Stunden kultivierter Peritonealmakrophagen in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Flächeneinheit. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen lebende Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

Um den Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phagozytosekapazität und Phagozytoseaktivität kultivierter Peritonealmakrophagen unabhängig von möglichen Beeinflussungen durch die Flächendichte der Zellen untersuchen zu können, wurde die Zellzahl pro Flächeneinheit standardisiert. Da bei Zellzahlen bis zu 125 Makrophagen pro mm^2 die Unterschiede hinsichtlich der Phagozytoseaktivität und Phagozytosekapazität zwischen behandelten und unbehandelten Peritonealmakrophagen am deutlichsten beobachtet werden konnten, wurde bei den später beschriebenen Untersuchungen über die Aktivierung von Peritonealmakrophagen die Zelldichte auf 125 Zellen pro mm^2 begrenzt.

Auch bei Knochenmarksmakrophagen konnte eine Beziehung zwischen der Flächendichte der Zellen und dem Phagozytoseverhalten der Makrophagen festgestellt werden (Abbildungen 14 und 15).
Als durchschnittliche Phagozytosekapazitäten wurden nach Aufnahme vitaler C.albicans bei einer Dichte von 125 Zellen pro mm^2 0,51 $\pm$ 0,46 C.albicans pro Makrophage, bei 250 Zellen pro mm^2 2,54 $\pm$ 0,66 und bei 375 Zellen pro mm^2 6,77 $\pm$ 0,86 Candida-Partikel pro Makrophage ermittelt. Wurden auch bei den Knochenmarksmakrophagen die Phagozytosekapazitäten auf den Anteil der tatsächlich phagozytoseaktiven Zellen an der ausgewerteten Makrophagenpopulation bezogen, so phagozytierten bei einer Dichte von 125 Zellen pro mm^2 15,75% $\pm$ 10,57 der Zellen 2,82 $\pm$ 1,12 C.albicans. Bei 250 Makrophagen pro mm^2 nahmen 43,25% $\pm$ 5,28 der Zellen durchschnittlich 5,93 $\pm$ 1,76 Candida-Partikel auf, und bei 375 Makrophagen pro mm^2 phagozytierten 82,50% $\pm$ 3,02 der Zellen im Mittel 8,22 $\pm$ 1,03 C.albicans.
Aufgrund dieser, in den Abbildungen 14 und 15 graphisch dargestellten Ergebnisse wurde auch bei den später beschriebenen Aktivierungsversuchen mit Knochenmarksmakrophagen die Zellzahl auf 125 adhärente Makrophagen pro mm^2 begrenzt, um eine Beeinflussung des Phagozytoseverhaltens der Makrophagen durch Schwankungen der Flächendichte der Zellen ausschließen zu können.

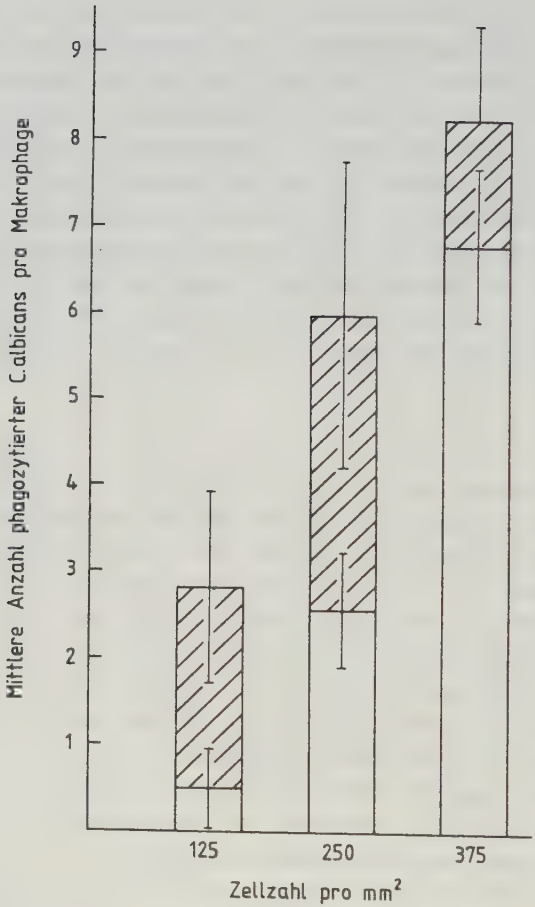

Abbildung 14

Phagozytosekapazität in vitro ausgereifter 7 Tage kultivierter Knochenmarksmakrophagen in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Flächeneinheit. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen vitale Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung. Weiße Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der gesamten Makrophagenpopulation; schraffierte Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der phagozytierenden Makrophagen.

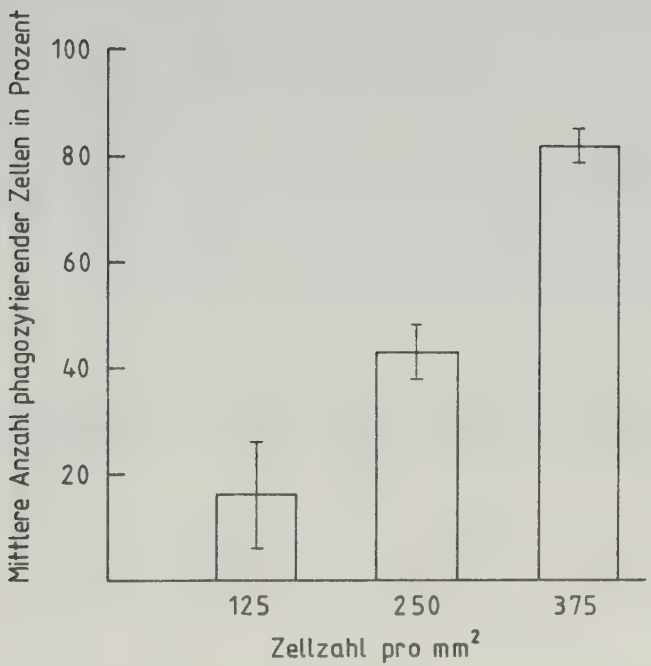

Abbildung 15

Phagozytoseaktivität in vitro ausgereifter 7 Tage kultivierter Knochenmarksmakrophagen in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Flächeneinheit. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen lebende Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen $\pm$ Standardabweichung.

Unterschiede im Phagozytoseverhalten von Knochenmarks- oder Peritonealmakrophagen wurden nicht nur zwischen verschieden dicht angesetzten Makrophagenkulturen beobachtet. Sie traten sogar in ein und derselben Zellkultur auf, wenn Bereiche unterschiedlicher Zelldichte getrennt voneinander ausgewertet wurden. Die Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit unterlag nämlich selbst in Kulturen mit standardisierten Zellzahlen gewissen Schwankungen. Es erwies sich deshalb als notwendig, nur jene Bereiche der Zellkulturen auszuwerten, welche die geforderte Flächendichte der Makrophagen aufwiesen, um überhaupt reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

4. Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phagozytosekapazität und -aktivität kultivierter Peritonealmakrophagen

Die Phagozytosekapazität kultivierter Peritonealmakrophagen war ebenso wie deren Phagozytoseaktivität bei konstanter Zellzahl pro Flächeneinheit vom Funktionszustand der Makrophagen abhängig. Aktivierende Behandlungen der Makrophagenkulturen mit Zytokinen oder Lymphokinen, die in Form von Zellkulturüberständen zugesetzt wurden (20%ig), führten zu einem Anstieg der mittleren Anzahl aufgenommener Candida-Partikel pro Zelle, wenn den Makrophagen vitale C.albicans zur Phagozytose angeboten wurden (Abbildung 16). Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil phagozytoseaktiver Zellen an der Gesamtzahl adhärenter Makrophagen (Abbildung 17).
Die Veränderungen im Phagozytoseverhalten der behandelten Zellen waren von der Einwirkungsdauer der aktivierenden Zusätze abhängig. Eine 96-stündige Behandlung der Makrophagen führte zu deutlicheren funktionellen Anzeichen einer Aktivierung als eine Behandlung über lediglich 48 Stunden.
Die mittlere Phagozytoseaktivität unbehandelter Peritonealmakrophagen betrug nach einer 48-stündigen Kultivierungsdauer im Mittel mehrerer Versuche nur 43,67% $\pm$ 5,51 bei einer durchschnittlichen Phagozytosekapazität von 1,17 $\pm$ 0,34 Candida-Partikeln pro Makrophage.

Nach einer 48-stündigen Behandlung mit zellfreiem Medium kultivierter Hühnerembryofibroblasten (HEF) phagozytierten 78,67% ± 2,08 der Zellen (Abbildung 17), und die mittlere Phagozytosekapazität der Makrophagenpopulation betrug 2,24 ± 0,29 C.albicans pro Zelle (Abbildung 16).
Nach entsprechend langer Einwirkung eines Überstandes kultivierter Kükennierenzellen (KN) nahmen die Makrophagen durchschnittlich 3,06 ± 0,56 Candida-Partikel auf; 80,67% ± 4,39 der Zellen waren phagozytoseaktiv, während nach Behandlung mit Kulturüberstand nicht stimulierter Thymuszellen (LK/T_0) 75,33% ± 8,74 der Makrophagen phagozytierten; die durchschnittliche Phagozytosekapazität betrug 2,83 ± 0,30 vitale C.albicans. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 16 und 17 graphisch dargestellt.
Wurde die Behandlungsdauer der Peritonealmakrophagen auf 96 Stunden ausgedehnt, so erhöhte sich der für die Phagozytosekapazität ermittelte Wert bei den unbehandelten Zellen auf 2,38 ± 0,21 C.albicans pro Makrophage bei durchschnittlich 73% ± 2,65 phagozytoseaktiven Zellen. Demgegenüber betrug die mittlere Phagozytosekapazität der Makrophagenpopulation nach Zusatz von HEF-Medium 5,06 ± 0,15 Candida-Partikel pro Makrophage, nach Zusatz von KN-Medium 4,87 ± 0,42 und nach Behandlung mit LK/T_0-Medium 4,70 ± 0,14 C.albicans pro Makrophage.
96 Stunden nach Zusatz von HEF-Überstand phagozytierten 90% ± 2,00 der Zellen Candida-Partikel, nach Zusatz von KN-Medium waren 90,33% ± 2,08 der Makrophagen phagozytoseaktiv, und 91% ± 3,61 der Makrophagen nahmen nach Behandlung mit LK/T_0-Medium vitale C.albicans auf.
Alle drei Mediumarten beeinflußten also die Phagozytoseaktivität und -kapazität etwa gleich stark. Jedoch besaß keine der drei Mediumarten antivirale Aktivitäten. Auch zytostatische Wirkungen kultivierter Knochenmarksmakrophagen ließen sich durch eine Behandlung mit derartigen Kulturüberständen nicht induzieren.
Die Abbildungen 16 und 17 zeigen eine graphische Darstellung der beschriebenen Ergebnisse.

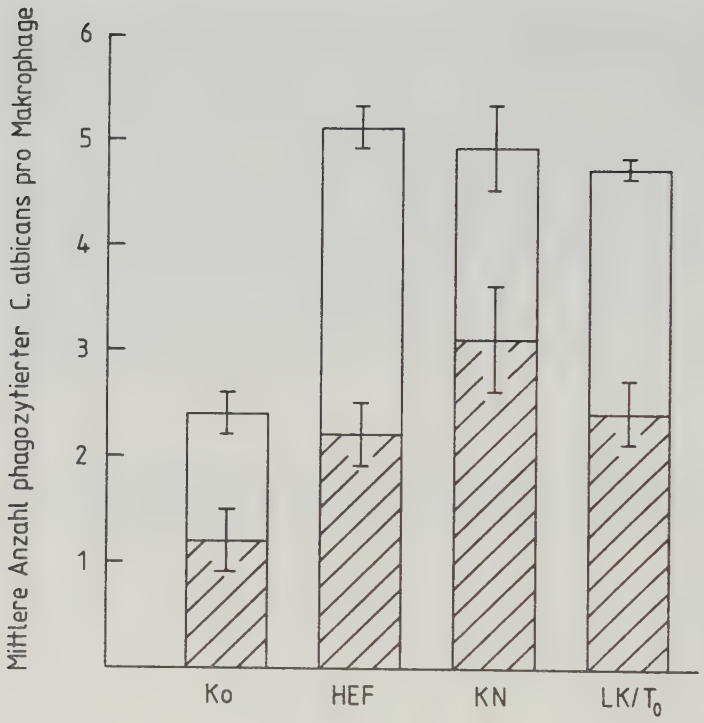

Abbildung 16

Phagozytosekapazität von Peritonealmakrophagen nach 48-stündiger (schraffierte Säulen) und 96-stündiger Behandlung (weiße Säulen) mit Kulturüberständen von Hühnerembryofibroblasten (HEF), Kükennierenzellen (KN) oder unstimulierten Thymuslymphozyten (LK/T_0). Als Kontrolle (Ko) dienten unbehandelte Peritonealmakrophagen. Zur Phagozytose wurden lebende Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen $\pm$ Standardabweichung.

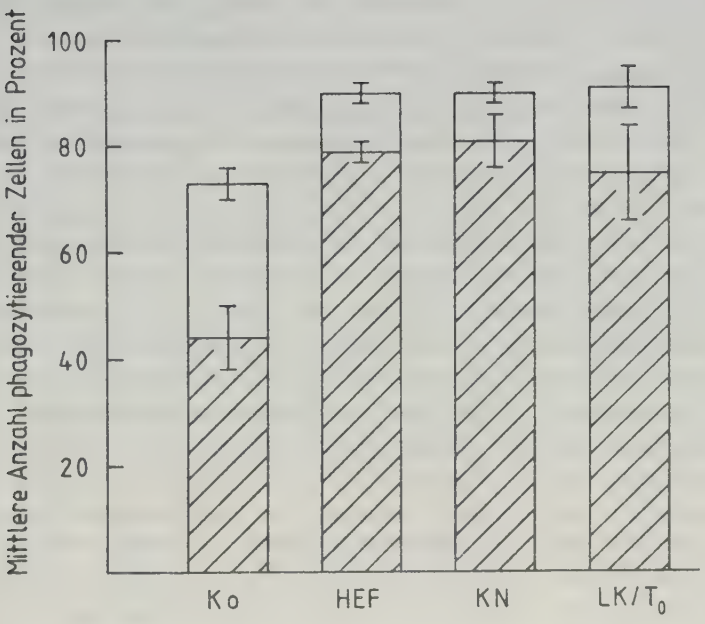

Abbildung 17

Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen nach 48-stündiger (schraffierte Säulen) und 96-stündiger Behandlung (weiße Säulen) mit Kulturüberständen von Hühnerembryofibroblasten (HEF), Kükennierenzellen (KN) oder unstimulierten Thymuslymphozyten (LK/T_0). Als Kontrolle (Ko) dienten unbehandelte Peritonealmakrophagen. Zur Phagozytose wurden lebende Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen $\pm$ Standardabweichung.

Die nach Behandlung mit Kulturmedium unstimulierter Thymuslymphozyten (LK/T_0) beobachtete Steigerung der Phagozytoseaktivität kultivierter Peritonealmakrophagen und die damit einhergegangene Erhöhung der durchschnittlichen Phagozytosekapazität waren von der Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur der Thymuslymphozyten unabhängig. Überstände unbehandelter, kultivierter Thymuszellen, die für 24, 48 bzw. 72 Stunden bei 38°C, 41°C oder 44°C bebrütet worden waren, induzierten in gleichem Umfang einen Anstieg der mittleren Anzahl phagozytierter C.albicans pro Makrophage, wenn sie den Makrophagenkulturen 10- bzw. 20%ig zugesetzt wurden. Die für die mittlere Phagozytosekapazität der so behandelten Peritonealmakrophagen ermittelten Werte erhöhten sich auf das 3,9- bis 4,1-fache im Vergleich zu entsprechenden Werten unbehandelter Kontrollkulturen.
Die durchschnittliche Phagozytoseaktivität der Makrophagenpopulation stieg um 40 bis 41,3%.
Demgegenüber war die Beeinflussung des Phagozytoseverhaltens kultivierter Peritonealmakrophagen durch zellfreie Überstände ConA-stimulierter Thymuslymphozytenkulturen (30µg ConA pro ml; $2x10^7$ Zellen pro ml), die als LK/T_1 bezeichnet werden, von der jeweiligen Kultivierungsdauer als auch von der Kultivierungstemperatur der Thymuszellen abhängig.
Wurden Peritonealmakrophagen über einen Zeitraum von 96 Stunden mit LK/T_1-Medium behandelt, so nahm ihre Fähigkeit zur Phagozytose vitaler C.albicans gegenüber den mit LK/T_0-Medium behandelten Zellen ab (Abbildung 18). Gleichzeitig verringerte sich die mittlere Anzahl phagozytierter Candida-Partikel pro Makrophage (Abbildung 19). Nach 10%igem Zusatz von Kulturüberständen ConA-stimulierter Thymuszellen (30µg ConA pro ml; $2x10^7$ Zellen pro ml), die bei 41°C für 72 Stunden kultiviert worden waren, unterschied sich die durchschnittliche Phagozytosekapazität in behandelten Makrophagenkulturen nur unwesentlich von der in unbehandelten Makrophagenkulturen; die Reduzierung der Phagozytoseaktivität und -kapazität war im Vergleich zu den mit LK/T_0-Medium behandelten Makrophagen jedoch am deutlichsten ausgeprägt.

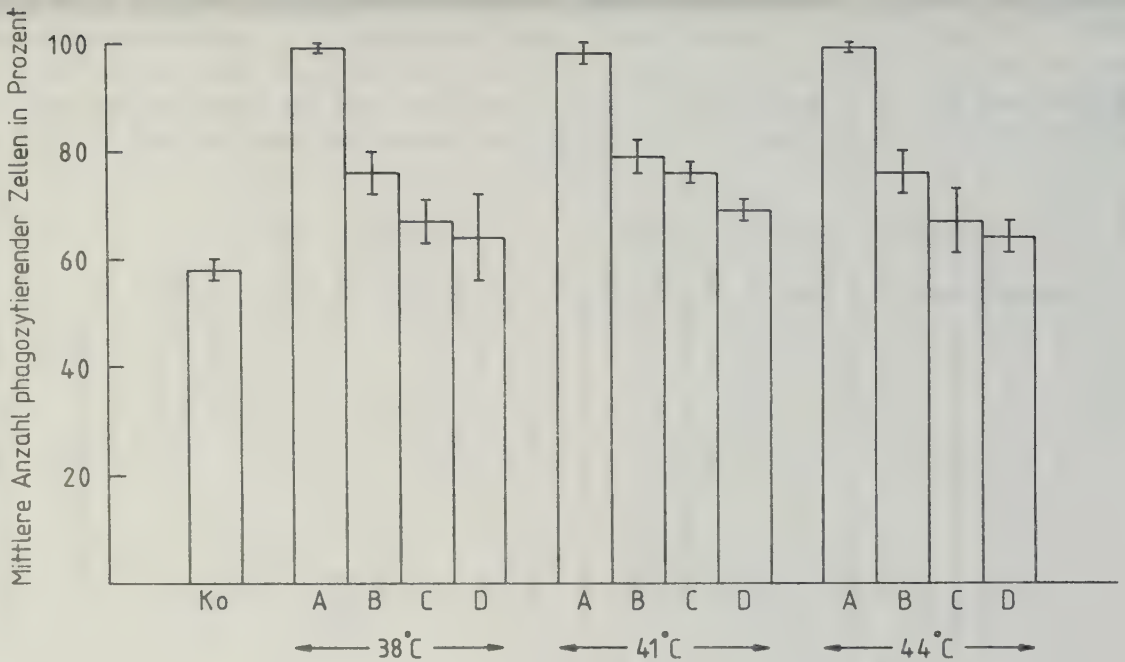

Abbildung 18

Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen nach 96-stündiger Behandlung mit zellfreiem Medium 72 Stunden alter nicht stimulierter (A) bzw. 24(B), 48(C) und 72 Stunden alter (D) ConA-stimulierter Thymuszellen, die bei 38°C, 41°C oder 44°C kultiviert wurden. Als Kontrolle (Ko) dienten unbehandelte Peritonealmakrophagen. Zur Phagozytose wurden vitale Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

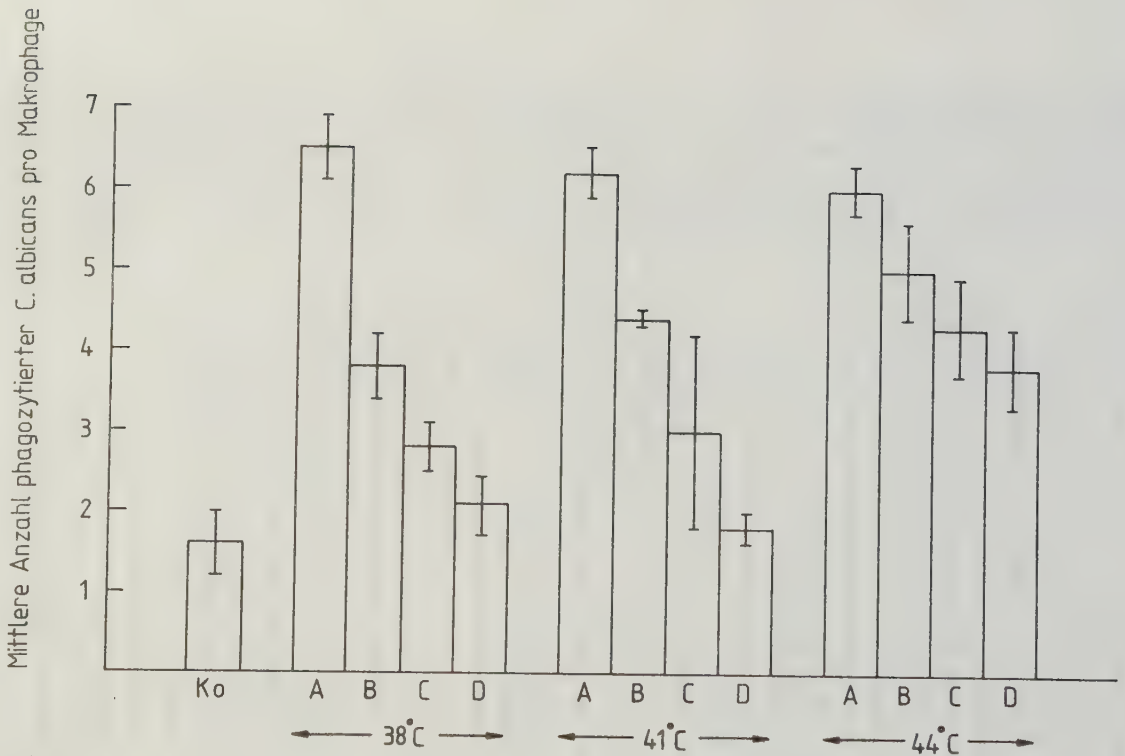

Abbildung 19

Phagozytosekapazität von Peritonealmakrophagen nach 96-stündiger Behandlung mit zellfreiem Medium 72 Stunden alter nicht stimulierter (A) bzw. 24(B), 48(C) und 72 Stunden alter (D) ConA-stimulierter Thymuszellen, die bei 38°C, 41°C oder 44°C kultiviert wurden. Als Kontrolle (Ko) dienten unbehandelte Peritonealmakrophagen. Zur Phagozytose wurden vitale Candida albicans angeboten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

Wurden Thymuszellen mit ConA (30µg pro ml) im Kulturmedium in einer Dichte von $2x10^7$ Zellen pro ml bei 38°C, 41°C oder 44°C für 24, 48 bzw. 72 Stunden inkubiert, so besaßen die nach gleichen Bebrütungszeiten aber unterschiedlichen Inkubationstemperaturen gewonnenen Überstände ähnliche biologische Aktivitäten hinsichtlich der Beeinflussung des Phagozytoseverhaltens von Peritonealmakrophagen. Mit zunehmender Länge der Inkubationsdauer ConA-stimulierter Thymuszellen ließen sich durch Einsatz der entsprechenden Überstände (LK/T) die Phagozytoseaktivität und -kapazität behandelter Makrophagen im Vergleich zur Behandlung mit Kulturmedium unstimulierter Thymuszellen (LK/T_o) zunehmend reduzieren. Am deutlichsten konnten diese Effekte beobachtet werden, wenn die Thymuszellen bei 41°C inkubiert worden waren, und am wenigsten deutlich waren diese Effekte ausgeprägt nach Kultivierung der Thymuszellen bei 44°C. Die Einzelwerte dieser Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 10

Durchschnittliche Phagozytosekapazität und -aktivität[1] von Peritonealmakrophagen nach 96-stündiger Behandlung mit Kulturüberständen von Thymuszellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert worden waren.

Behandlung der Makrophagen mit			Phagozytose-kapazität[2]	Phagozytose-aktivität(%)[2]
unbehandelt			1,56 ± 0,39	58,00 ± 2,00
Zellfreiem Medium von Thymuszellkulturen, die inkubiert worden waren bei	38°C	für 24 Std.(30µg ConA/ml)	3,85 ± 0,35	76,00 ± 3,61
		für 48 Std.(30µg ConA/ml)	2,79 ± 0,29	67,33 ± 4,16
		für 72 Std.(30µg ConA/ml)	2,07 ± 0,36	64,33 ± 7,51
		für 72 Std.(ohne ConA)	6,64 ± 0,40	99,33 ± 1,16
	41°C	für 24 Std.(30µg ConA/ml)	4,38 ± 0,14	79,00 ± 2,65
		für 48 Std.(30µg ConA/ml)	2,98 ± 1,24	75,67 ± 2,08
		für 72 Std.(30µg ConA/ml)	1,75 ± 0,22	58,67 ± 2,31
		für 72 Std.(ohne ConA)	6,20 ± 0,28	98,00 ± 2,00
	44°C	für 24 Std.(30µg ConA/ml)	4,97 ± 0,60	84,33 ± 4,04
		für 48 Std.(30µg ConA/ml)	4,27 ± 0,59	83,67 ± 6,03
		für 72 Std.(30µg ConA/ml)	3,78 ± 0,51	77,33 ± 2,52
		für 72 Std.(ohne ConA)	6,02 ± 0,28	98,67 ± 1,16

1) Phagozytosekapazität = Mittlere Anzahl phagozytierter Candida albicans pro Makrophage.
Phagozytoseaktivität = Durchschnittlicher Anteil phagozytierender Zellen.
Zur Phagozytose wurden vitale Candida albicans angeboten

2) Angegeben sind Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen ± Standardabweichung.

5. Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phagozytosekapazität und -aktivität kultivierter Knochenmarksmakrophagen

Die Phagozytosekapazität und die Phagozytoseaktivität kultivierter Knochenmarksmakrophagen ließen sich durch eine Behandlung mit Zellkulturüberständen unterschiedlicher Herkunft erheblich steigern (Abbildungen 20 und 21).
24 Stunden nach einem 20%igen Zusatz von KN-Medium zu 5 Tage alten, in vitro ausgereiften Knochenmarksmakrophagen (125 adhärente Makrophagen pro mm^2) phagozytierten die behandelten Zellen im Mittel von zwei Versuchsansätzen durchschnittlich 7,43 (8,77 pro phagozytoseaktive Zelle) vitale Candida albicans, während von den unbehandelten Makrophagen nur 1,13 (3,97) Candida-Partikel aufgenommen wurden.
Nach 24-stündiger Behandlung mit HEF-Medium phagozytierten die Makrophagen durchschnittlich 4,96 (6,59) C.albicans, und nach entsprechend langer Einwirkung eines Überstandes 4 Tage inkubierter dichtgewachsener Knochenmarksmakrophagenkulturen (KM) konnten im Mittel 6,34 (7,78) Candida-Partikel pro Makrophage gezählt werden (Abbildung 20).
In 6 Tage alten unbehandelten Knochenmarksmakrophagenkulturen waren 28,7% der Zellen phagozytoseaktiv, nahmen aber, wie oben gezeigt, nur sehr wenig vitale Candida albicans auf. Demgegenüber betrug der Anteil phagozytoseaktiver Zellen in den für 24 Stunden mit HEF-Medium vorbehandelten Zellkulturen 75,3%. Nach Behandlung mit KM-Medium erhöhte er sich auf 81,2%, und in der mit KN-Medium vorbehandelten Makrophagenpopulation waren sogar 84,5% der Zellen phagozytoseaktiv (Abbildung 21).
Ein ebenso deutlicher, phagozytosesteigernder Effekt konnte nach Behandlung der kultivierten Knochenmarksmakrophagen mit einer Lymphokin-Präparation festgestellt werden. Hierzu wurden den Makrophagenkulturen 20% eines zellfreien Überstandes von Milzzellkulturen zugesetzt ($2x10^7$ Milzzellen in serumhaltigem Kulturmedium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden inkubiert).

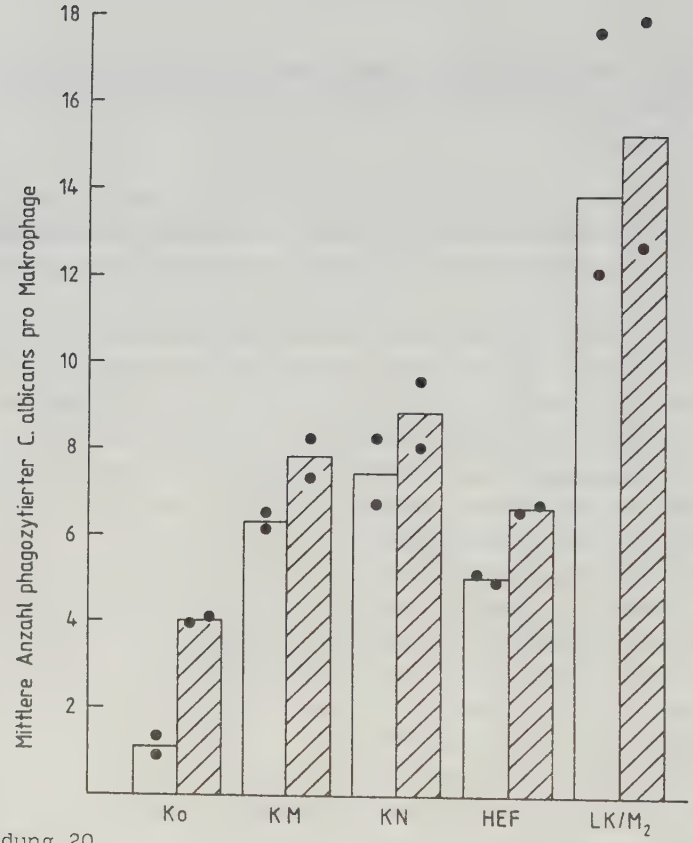

Abbildung 20

Phagozytosekapazität 6 Tage alter, in vitro ausgereifter Knochenmarksmakrophagen ohne Vorbehandlung (Ko), und nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Kulturüberständen von dichtgewachsenen Knochenmarksmakrophagen (KM), Kükennierenzellen (KN), Hühnerembryofibroblasten (HEF) oder von Milzzellen ($2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert)(LK/M_2). Die Überstände wurden jeweils 20%ig zugesetzt. Die Einzelwerte sind als Punkte, die Mittelwerte von zwei Versuchen sind als Säulen eingezeichnet. Weiße Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der gesamten Makrophagenpopulation; schraffierte Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der phagozytoseaktiven Makrophagen. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen vitale Candida albicans angeboten.

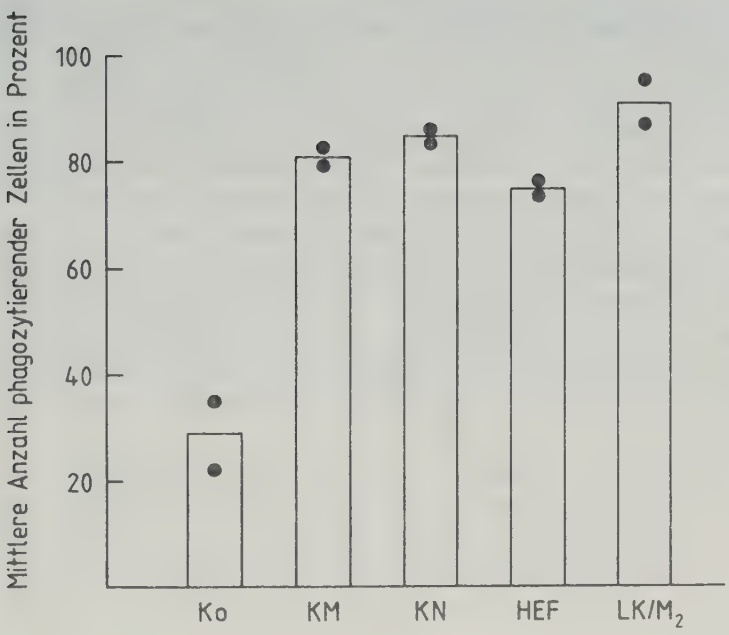

Abbildung 21

Phagozytoseaktivität 6 Tage alter, in vitro ausgereifter Knochenmarksmakrophagen ohne Vorbehandlung (Ko), und nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Kulturüberständen von dichtgewachsenen Knochenmarksmakrophagen (KM), Kükennierenzellen (KN), Hühnerembryofibroblasten (HEF) oder von Milzzellen ($2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert)(LK/M_2). Die Überstände wurden jeweils 20%ig zugesetzt. Die Einzelwerte sind als Punkte, die Mittelwerte von zwei Versuchen sind als Säulen eingezeichnet. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen vitale Candida albicans angeboten.

Während weder HEF- oder KM-Medium noch KN-Medium antivirale oder Zytostase-induzierende Aktivitäten besaßen, konnten im Überstand der beschriebenen Milzzellkulturen 1348 IFN-Einheiten pro 0,1ml und 1070 50% Zytostase-induzierende Einheiten (ZID) pro ml gemessen werden. Nach einer 24-stündigen Einwirkung dieser Lymphokin-Präparation (LK/M_2) phagozytierten 91% der behandelten Zellen, während in den unbehandelten Kontrollkulturen nur 28,7% der Zellen phagozytoseaktiv waren. Die mittlere Anzahl phagozytierter C.albicans pro Makrophage betrug 24 Stunden nach Zusatz des Lymphokins 13,75 (15,22). In den Kontrollkulturen konnten demgegenüber nur durchschnittlich 1,13 (3,97) Candida-Partikel pro Makrophage gezählt werden. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 20 und 21 graphisch dargestellt.

Wurde die Behandlungsdauer der Knochenmarksmakrophagen-Kulturen auf 48 Stunden verlängert, die Zytokin-haltigen bzw. Lymphokinhaltigen Zellkulturüberstände jedoch nurmehr 10%ig zugesetzt, so führten die Phagozytoseversuche mit vitalen C.albicans zu ähnlichen Resultaten. Sowohl Kulturüberstände von ConA-stimulierten Milzzellen als auch Überstände von kultivierten, ConA-stimulierten Thymuszellen induzierten in den mit ihnen behandelten Makrophagenkulturen eine eindrucksvolle Steigerung der Phagozytoseaktivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen (Abbildung 22).
Wurden Überstände ConA-stimulierter Milzzellen (7,5µg ConA pro ml; $1x10^7$ Zellen pro ml), die in serumfreiem Medium für 72 Stunden bei 41°C inkubiert worden waren (LK/M_1) und deutlich niedrigere antivirale und Zytostase-induzierende Aktivitäten besaßen als LK/M_2-Medium, kultivierten Knochenmarksmakrophagen zugesetzt (10%ig), so nahmen nach 48-stündiger Einwirkungsdauer 90,3% der behandelten Zellen lebende C.albicans auf; in unbehandelten Kontrollkulturen waren dagegen nur 15,8% der Zellen phagozytoseaktiv. Überstände entsprechender nicht ConA-stimulierter Milzzellen (LK/M_0), die nahezu keine antiviralen oder Zytostase-induzierenden Aktivitäten besaßen, induzierten eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität auf lediglich 32,3%.
Nach Zusatz des Milzzell-Lymphokins LK/M_2 phagozytierten im Mittel 94,9% der Makrophagenpopulation. Wurden die Makrophagen

für 48 Stunden mit zellfreiem Medium ConA-stimulierter Thymuszellen (30µg ConA pro ml; $2x10^7$ Zellen pro ml), die für 72 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert worden waren (LK/T_1), behandelt, so phagozytierten sämtliche Zellen, d.h. die Phagozytoseaktivität betrug 100%. Diese Befunde sind in Abbildung 22 dargestellt.

Ebenso deutlich wie die Phagozytoseaktivität wurde auch die Phagozytosekapazität der Knochenmarksmakrophagen durch die Lymphokin-Behandlung beeinflußt (Abbildung 23). Betrug die mittlere Anzahl phagozytierter C.albicans pro Makrophage in 7 Tage alten, in vitro ausgereiften Knochenmarksmakrophagen-Kulturen durchschnittlich 0,51 (2,82 bezogen auf die phagozytoseaktiven Zellen) Candida-Partikel pro Zelle, so konnten nach 48-stündiger Vorbehandlung der Kulturen mit LK/M_1-Medium im Mittel 14,65 (16,27) C.albicans pro Makrophage gezählt werden. Nach entsprechend langer Einwirkung des LK/M_2-Kulturüberstandes wurde für die durchschnittliche Phagozytosekapazität ein Wert von 19,09 (20) und nach Zusatz des LK/T_1-Mediums ein Wert von 25,88 (25,88) Candida-Partikel pro Zelle ermittelt.
Ein 10%iger Zusatz von LK/M_0-Überstand zu den Makrophagenkulturen führte im Vergleich zu den Kontrollkulturen nur zu einer Erhöhung der mittleren Anzahl phagozytierter C.albicans pro Makrophage auf 1,15 (3,68) Candida-Partikel pro Zelle.
Wurden die Knochenmarksmakrophagen-Kulturen über einen Zeitraum von 48 Stunden mit 10% HEF-Medium behandelt, so war die zu beobachtende Steigerung der Phagozytoseaktivität im Vergleich zu unbehandelten Kulturen nicht so deutlich ausgeprägt wie nach einer 24-stündigen Behandlung mit einem 20%igen Zusatz von HEF-Medium. Nur 31,5% der behandelten Zellen waren phagozytoseaktiv, und im Mittel wurden 1,16 (3,71) Candida-Partikel pro Makrophage phagozytiert.

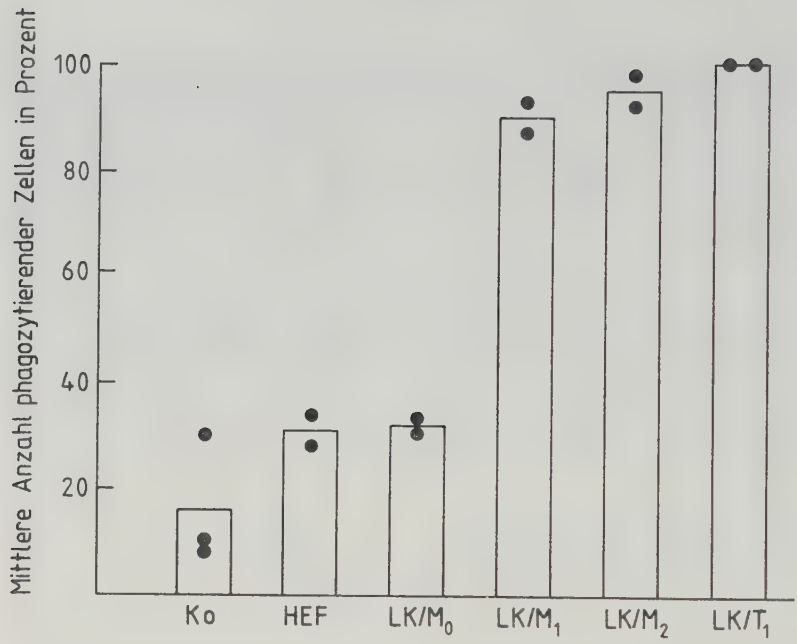

Abbildung 22

Phagozytoseaktivität 7 Tage alter, in vitro ausgereifter Knochenmarksmakrophagen ohne Vorbehandlung (Ko), und nach 48-stündiger Vorbehandlung mit Zytokinen bzw. Lymphokinen, die den Kulturen in Form von Zellkulturüberständen zugesetzt wurden (10%iger Zusatz). HEF: Hühnerembryofibroblasten-Medium; LK: Lymphokin-haltige Überstände von Milzzellkulturen (LK/M) bzw. Thymuszellkulturen (LK/T), die auf verschiedene Arten gewonnen wurden. LK/M_0: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Kulturmedium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_1: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Kulturmedium mit ConA-Zusatz (7,5µg pro ml) für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_2: $2x10^7$ Milzzellen pro ml in serumhaltigem Kulturmedium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/T_1: $2x10^7$ Thymuszellen pro ml in serumhaltigem Kulturmedium mit ConA-Zusatz (30µg pro ml) für 72 Stunden bei 41° inkubiert. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen vitale Candida albicans angeboten. Die Einzelwerte sind als Punkte, die Mittelwerte von zwei Versuchen sind als Säulen eingezeichnet.

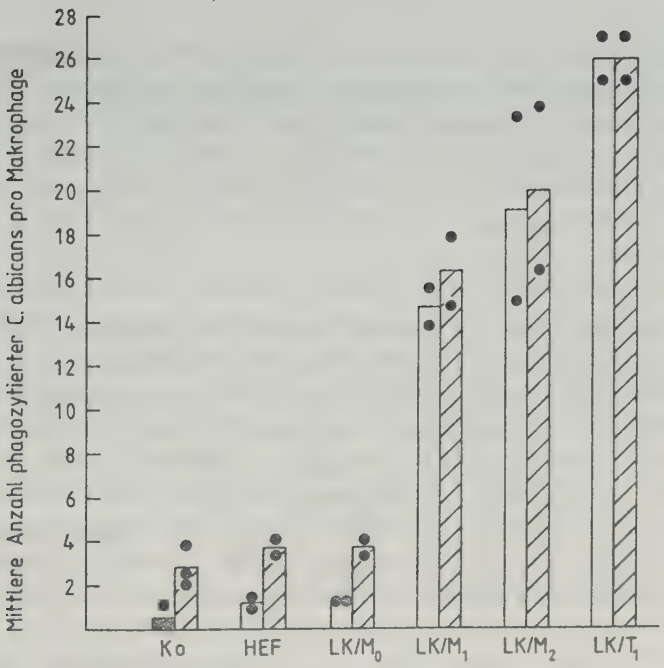

Abbildung 23

Phagozytosekapazität 7 Tage alter, in vitro ausgereifter Knochenmarksmakrophagen ohne Vorbehandlung (Ko), und nach 48-stündiger Vorbehandlung mit Zytokinen bzw. Lymphokinen, die den Kulturen in Form von Zellkulturüberständen zugesetzt wurden (10%iger Zusatz). HEF: Hühnerembryofibroblasten-Medium; LK: Lymphokin-haltige Überstände von Milzzellkulturen (LK/M) bzw. Thymuszellkulturen (LK/T), die auf verschiedene Arten gewonnen wurden. LK/M_0: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_1: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Kulturmedium mit ConA-Zusatz (7,5µg pro ml) für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_2: $2x10^7$ Milzzellen pro ml in serumhaltigem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/T_1: $2x10^7$ Thymuszellen pro ml in serumhaltigem Medium mit ConA-Zusatz (30µg pro ml) für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. Zur Phagozytose wurden den Makrophagen vitale C.albicans angeboten. Die Einzelwerte sind als Punkte, die Mittelwerte von zwei Versuchen sind als Säulen eingezeichnet. Weiße Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der gesamten Makrophagenpopulation; schraffierte Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der phagozytoseaktiven Makrophagen.

Die bisher dargestellten Resultate zeigen, daß unbehandelte kultivierte Knochenmarksmakrophagen lebende Candida albicans unter den beschriebenen Bedingungen nur in einem sehr begrenzten Umfang zu phagozytieren vermochten. Eine deutliche Erhöhung der Phagozytosekapazität und -aktivität konnte erst nach Behandlung der Makrophagen mit Zytokinen bzw. Lymphokinen beobachtet werden.
Wurden den Makrophagen jedoch keine vitalen, sondern stattdessen hitzeinaktivierte C.albicans zur Phagozytose angeboten, so ergaben sich hinsichtlich des Phagozytoseverhaltens der Zellen völlig andere Resultate. In Kulturen 7 Tage alter, in vitro ausgereifter Knochenmarksmakrophagen waren bereits 93,5% der unbehandelten Makrophagen in der Lage, hitzeinaktivierte Candida-Partikel zu phagozytieren. Daher ließ sich, wie in Abbildung 24 dargestellt, auch durch eine Behandlung der Makrophagenkulturen mit Zytokinen bzw. Lymphokinen (jeweils 10%iger Zusatz) keine eindeutige Steigerung der Phagozytoseaktivität mehr induzieren. Nach 48-stündiger Vorbehandlung der Kulturen mit HEF-Medium betrug die durchschnittliche Phagozytoseaktivität 98,5%, während nach entsprechend langer Einwirkung der Lymphokine LK/M_1 oder LK/M_2 92,1% bzw. 97,4% der Zellen phagozytoseaktiv waren. Auch wenn die Kulturen mit LK/M_0 behandelt worden waren, nahmen 99,8% der Makrophagen hitzeinaktivierte C.albicans auf.
Wurde die mittlere Anzahl phagozytierter hitzeinaktivierter C.albicans pro Makrophage in den unterschiedlich behandelten Kulturen bestimmt, so hatten unbehandelte Makrophagen ebenso wie Zytokin- oder Lymphokin-behandelte Makrophagen jeweils ihrer Größe und damit ihrem Fassungsvermögen entsprechend viele Candida-Partikel aufgenommen. Während in unbehandelten Kontrollkulturen mit relativ kleinen Zellen durchschnittlich 10,52 (11,34) Candida-Partikel pro Makrophage gezählt werden konnten, wurden in den behandelten Makrophagenkulturen mit erheblich größeren Zellen deutlich höhere Werte für die mittleren Phagozytosekapazitäten ermittelt (Abbildung 25), wenn auch nicht so eindeutig, wie bei den Versuchen mit vitalen C.albicans.
Die Phagozytosekapazität betrug nach Behandlung mit HEF-Medium 18,69 (18,89) abgetöteter C.albicans pro Makrophage. Nach 48-stündiger Einwirkung des LK/M_0-Überstandes wurden 18,48 (18,52),

nach Zusatz des LK/M_1-Mediums 15,04 (16,22) hitzeinaktivierte Candida-Partikel pro Makrophage gezählt. Makrophagen, die mit dem Milzzell-Lymphokin LK/M_2 vorbehandelt worden waren, nahmen durchschnittlich 21,55 (22,09) hitzeinaktivierte C.albicans auf.

In den dargestellten Untersuchungen zur Beeinflussung des Phagozytoseverhaltens kultivierter Makrophagen durch aktivierende Behandlungen konnten unterschiedliche Reaktionen von Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen beobachtet werden. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Sowohl bei Peritonealmakrophagen als auch bei Knochenmarksmakrophagen konnte eine Beziehung zwischen der Flächendichte der Zellen und ihrem Phagozytoseverhalten festgestellt werden. Um den Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phagozytosekapazität und Phagozytoseaktivität kultivierter Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen unabhängig von möglichen Beeinflussungen durch die Flächendichte der Zellen untersuchen zu können, wurde bei den Phagozytoseversuchen die Zelldichte auf 125 Zellen pro mm^2 begrenzt. Da die Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit selbst in Kulturen mit standardisierten Zellzahlen gewissen Schwankungen unterlag, wurden darüber hinaus nur jene Bereiche der Zellkulturen ausgewertet, welche die geforderte Flächendichte der Makrophagen aufwiesen, um überhaupt reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.
Aktivierende Behandlungen mit Lymphokin-Präparationen führten bei Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen zu unterschiedlichen Resultaten. Während bei Knochenmarksmakrophagen eine mit steigendem ZID- und IFN-Gehalt der Lymphokin-Präparationen einhergehende Erhöhung der Phagozytoseaktivität und -kapazität zu beobachten war, nahm die Phagozytosetätigkeit der Peritonealmakrophagen mit fallendem Lymphokin-Gehalt der zur Behandlung verwendeten Kulturüberstände zu.
Kulturüberstände, in denen mit unseren Nachweismethoden keine Lymphokin-Aktivitäten gemessen werden konnten, wie HEF- oder KN-Medium förderten die Phagozytosetätigkeit sowohl von Peritoneal- als auch von Knochenmarksmakrophagen.

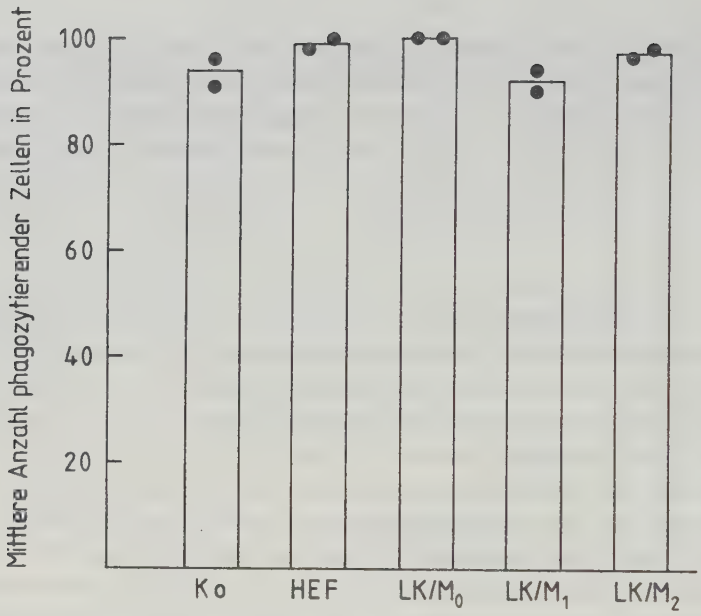

Abbildung 24

Phagozytose hitzeinaktivierter Candida albicans durch kultivierte Knochenmarksmakrophagen nach unterschiedlichen Vorbehandlungen. Anteil phagozytoseaktiver Zellen in 7 Tage alten, in vitro ausgereiften Knochenmarksmakrophagen-Kulturen ohne Vorbehandlung (Ko), und nach 48-stündiger Vorbehandlung der Makrophagen mit Zytokinen oder Lymphokinen, die den kultivierten Makrophagen in Form von Zellkulturüberständen zugesetzt wurden (jeweils 10%iger Zusatz). HEF: Hühnerembryofibroblasten-Medium; LK/M:Lymphokinhaltige Überstände von Milzzellkulturen, die auf verschiedene Arten gewonnen wurden. LK/M_0: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_1: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Medium mit ConA-Zusatz (7,5µg pro ml) für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_2: $2x10^7$ Milzzellen pro ml in serumhaltigem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. Die Einzelwerte sind als Punkte, die Mittelwerte von zwei Versuchen sind als Säulen eingezeichnet.

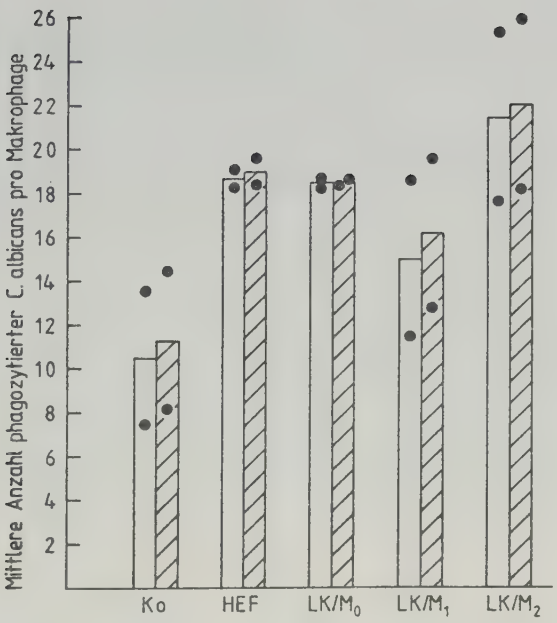

Abbildung 25

Aufnahme von hitzeinaktivierten Candida albicans durch 7 Tage alte, in vitro ausgereifte Knochenmarksmakrophagen ohne Vorbehandlung (Ko) und nach 48-stündiger Vorbehandlung der Makrophagen mit Zytokinen oder Lymphokinen, die den Makrophagenkulturen in Form von Zellkulturüberständen zugesetzt wurden (jeweils 10%iger Zusatz).
HEF: Hühnerembryofibroblasten-Medium; LK/M: Lymphokin-haltige Überstände von Milzzellkulturen, die auf verschiedene Arten gewonnen wurden. LK/M_0: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_1: $1x10^7$ Milzzellen pro ml in serumfreiem Medium mit ConA-Zusatz (7,5µg pro ml) für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. LK/M_2: $2x10^7$ Milzzellen pro ml in serumhaltigem Medium ohne ConA-Zusatz für 72 Stunden bei 41°C inkubiert. Die Einzelwerte sind als Punkte, die Mittelwerte von zwei Versuchen sind als Säulen eingezeichnet. Weiße Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der gesamten Makrophagenpopulation, schraffierte Säulen: durchschnittliche Phagozytosekapazität der phagozytoseaktiven Makrophagen.

E. Diskussion

Eine Untersuchung, die die Gewinnung und funktionelle Charakterisierung von Lymphokinen zum Ziel hat, ist von vornherein problematisch und mit gewissen Unzulänglichkeiten verbunden. Dies trifft um so mehr zu, wenn,wie in der vorliegenden Arbeit, die bisher nur wenig untersuchten aviären Lymphokine im Mittelpunkt des Interesses stehen. Es ist nämlich bis heute mit außerordentlichen Schwierigkeiten verbunden, wenn nicht gar unmöglich, einzelne Lymphokine aus Überständen kultivierter, Mitogen-stimulierter Lymphozyten zu isolieren, und sie getrennt voneinander auf ihre biologischen Wirkungen oder chemisch-physikalischen Eigenschaften zu untersuchen. Die Gründe hierfür liegen unter anderem in den hohen analytischen Anforderungen derartiger Experimente, die bisher erst teilweise beim Säuger erfüllt werden konnten, aber auch in der damit verbundenen mangelnden Verfügbarkeit ausreichender Mengen gereinigten Materials.
So werden Untersuchungen über Lymphokine häufig auf anderen Wegen durchgeführt, und können sich, selbst noch beim Säuger, auf die Beschreibung einzelner biologischer Effekte von unfraktionierten Kulturüberständen stimulierter Lymphozyten beschränken (Cohen, 1983; Freund und Pick, 1985). Da solche Kulturüberstände aber eine Vielzahl unterschiedlicher Lymphokin-Aktivitäten enthalten (Fitch et al., 1983; Bödecker et al., 1984), über deren mögliche Wechselwirkungen zudem noch weitgehend Unklarheit herrscht (Falk und Männel, 1983; Männel und Falk, 1983), ist es problematisch, bestimmte biologische Wirkungen der Anwesenheit einzelner Lymphokine zuzuschreiben.
Dies gilt es auch zu berücksichtigen, wenn im Zusammenhang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit die beiden Lymphokine Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF) und Immun-Interferon (IFN-γ) genannt werden.
Die enge Verbundenheit der Makrophagen-aktivierenden Wirksamkeit und der antiviralen Aktivität der untersuchten Kulturüberstände, bei gleichzeitig vorhandenen unterschiedlichen Säure- und Hitzestabilitäten, deuten darauf hin, daß diese beiden

Effekte durch zwei voneinander unabhängige Lymphokine induziert wurden, deren Produktion jedoch in enger Beziehung zueinander zu stehen scheint, es sei denn, die beobachteten biologischen Wirkungen wurden durch sterisch getrennte Bereiche eines einzigen Moleküls vermittelt. Dafür existieren nun aber keinerlei Anhaltspunkte, zumal es inzwischen auch Hinweise gibt, daß MAF- und IFN-γ-Aktivitäten durch klonierte T-Lymphozyten bzw. T-Hybridoma-Zellen der Maus unabhängig voneinander produziert werden können (Hamann und Krammer, 1983; Kaltmann et al., 1983).
Ob es sich bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen biologischen Wirkungen tatsächlich um den Ausdruck zweier voneinander verschiedener Lymphokine gehandelt hat und nicht vielmehr noch weitere Faktoren für die Induktion der Zytostase-induzierenden und antiviralen Effekte verantwortlich waren, kann nur in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen experimentellen Beitrag zur Gewinnung und funktionellen Charakterisierung von MAF und IFN-γ aus Lymphozytenkulturen des Huhnes zu leisten.
Zum Nachweis dieser beiden Lymphokin-Aktivitäten wurde zellfreies Medium unterschiedlich gewonnener und unter verschiedenen Bedingungen kultivierter Thymus-, Milz- und Bursazellen untersucht. Die verwendeten Zellkulturen bestanden regelmäßig zu über 90% aus lymphoiden Zellen, soweit dies durch eine mikroskopische Beurteilung von nach Pappenheim gefärbten Zellausstrichen festgestellt werden konnte. Untersuchungen zur Verteilung der T- und B-Lymphozyten in diesen Zellkulturen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt. Jedoch liegen hierzu Angaben anderer Autoren vor. Potworowski (1972) sowie Albini und Wick (1974) geben den Anteil der T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation der lymphoiden Zellen im Thymus von ca. 8 Wochen alten Hühnern der Rasse "Weiße Leghorn" mit über 80% an, während ihr Anteil in der Milz ca. 60%, in der Bursa Fabricii aber nur etwa 5% beträgt.

Der geringe Anteil von so potenten Lymphokin-Produzenten, wie den T-Lymphozyten, in der Bursa Fabricii erklärt vermutlich auch unsere Ergebnisse, wonach kultivierte Bursalymphozyten selbst nach ConA-Behandlung der Zellkulturen weder Zytostase-induzierende noch antivirale Aktivitäten zu produzieren vermochten. Allerdings stellt das verwendete lösliche ConA in seiner tetrameren Form auch ein reines T-Zell-Mitogen dar, welches zwar gleichermaßen von B-Lymphozyten gebunden wird, jedoch nur beim T-Lymphozyten eine funktionelle Änderung des Zellmetabolismus zu induzieren vermag (Andersson et al., 1972; Greaves und Bauminger, 1972; Ashman, 1984).

Nun geben aber allein die unterschiedlichen prozentualen Anteile von T-Lymphozyten in den Zellkulturen aus Thymus, Milz und Bursa Fabricii keine ausreichende Erklärung für die verschieden hohen Lymphokin-Gehalte der aus diesen Kulturen gewonnenen Überstände. Denn in Milzzellkulturen wurden unter optimalen Bedingungen etwa 10-mal so hohe Lymphokin-Gehalte gemessen, wie in Überständen kultivierter Thymuszellen, obwohl der Anteil der T-Lymphozyten an der lymphoiden Zellpopulation des Thymus höher ist als bei der Milz. Zu ähnlichen Resultaten kommen auch Altman und Kirchner (1972, 1974) in ihren Untersuchungen, die sich auf ein anderes aviäres Lymphokin, nämlich den monocyte-chemotactic-factor beziehen. Auch Altman und Kirchner (1972, 1974) konnten in Überständen kultivierter, ConA-stimulierter Bursalymphozyten keine, in Thymuszellkulturüberständen nur mäßige, in Überständen kultivierter, ConA-stimulierter Milzzellen dagegen jedoch deutliche Lymphokin-Aktivitäten nachweisen.

Stobo et al.(1974) führen das geringe Vermögen von Thymuszellen zur Lymphokin-Produktion, zumindest bei der Maus, auf eine mangelnde Reife der Thymozyten zurück, indem sie zeigen, daß die Lymphokin-Produktion an Theta-Antigen-tragende T-Lymphozyten gebunden ist und diese reifen T-Lymphozyten nur in der Milz in ausreichender Zahl vorkommen.

Untersuchungen zur Exprimierung bestimmter, für die Ausgereiftheit von T-Lymphozyten charakteristischer Membran-Antigene wurden von uns nicht durchgeführt, da entsprechende Antiseren nicht verfügbar waren. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß bereits ein 5%iger Zusatz autologer Milzzellen zu Thymuszellkultu-

ren die Lymphokin-Produktion unter optimalen Bedingungen um das etwa 10-fache zu steigern vermochte, so daß im Medium dieser Mischkulturen ebenso hohe Lymphokin-Gehalte gemessen werden konnten, wie in reinen Milzzellkulturen unter optimalen Kultivierungsbedingungen. Eine dem 5%igen Zusatz entsprechende Anzahl für sich allein inkubierter Milzzellen produzierte vergleichsweise geringe Lymphokin-Mengen.
Aufgrund dieser Zusammenhänge lassen sich die niedrigen Lymphokin-Gehalte der Thymuszellkulturüberstände nicht, oder zumindest nicht ausschließlich durch einen möglicherweise zu geringen Differenzierungsgrad der Thymozyten erklären. Es wird vielmehr vermutet, daß der außerordentlich geringe Anteil sogenannter B-L-positiver akzessorischer Zellen in Thymuszellkulturen des Huhnes (Duncan und McArthur, 1978; Peck et al., 1982) für die in unseren, aber auch in Versuchen anderer Autoren gemessenen niedrigen Lymphokin-Gehalte der Thymuszellkulturüberstände verantwortlich war.
Der Anteil der für eine Antigen-Präsentation erforderlichen B-L-positiven Makrophagen beträgt im Thymus 3 Wochen alter Hühner weniger als 2% der Thymuszellen (Oliver und LeDouarin, 1984), und reicht damit offensichtlich nicht aus, um in entsprechenden Zellkulturen eine maximale Lymphokin-Produktion zu ermöglichen. Unsere Untersuchungen haben nämlich gezeigt, daß die volle Wiederherstellung der Lymphokin-Produktion in Nylonfaser-fraktionierten Milzzellkulturen einen mindestens 5%igen Zusatz autologer Milzmakrophagen erfordert. Ein lediglich 2%iger Zusatz vermochte die Lymphokin-Produktion dagegen nur teilweise wiederherzustellen. Der Anteil B-L-positiver Zellen ist in der Milz erheblich höher als im Thymus (Peck et al., 1982).
Die Bedeutung der Anwesenheit ausreichender Mengen akzessorischer Zellen für eine optimale Lymphokin-Produktion durch Mitogen-stimulierte Lymphozyten wurde auch von anderen Autoren herausgestellt. Epstein et al.(1971), die in Lymphozytenkulturen des Menschen nach PHA-Stimulierung nur geringe antivirale Aktivitäten, in Makrophagenkulturen dagegen keine antiviralen Aktivitäten nachweisen konnten, zeigten jedoch, daß durch Kokultivierung von Lymphozyten und Makrophagen die IFN-γ-Aktivität um ein Vielfaches gesteigert, und die Produktion damit optimiert werden kann.

Die erhöhte zelluläre Aktivität Mitogen-stimulierter T-Lymphozyten wird von zahlreichen Autoren immer noch, und auch bei Lymphozyten des Huhnes, durch eine Messung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus qualitativ und quantitativ erfaßt (Thiel und Burkhardt, 1984; Vainio und Ratcliffe, 1984). In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine derartige Bewertung der Lymphozyten-Stimulierung verzichtet, da die Lymphokin-Produktion durch Mitogen-stimulierte T-Lymphozyten nicht unbedingt mit einem vermehrten Thymidin-Einbau der stimulierten Zellen korreliert (Neumann und Sorg, 1977; Wietzerbin et al., 1978). Neumann und Sorg (1977) zeigten dies am Beispiel der IFN-γ-Produktion durch Milzzellen der Maus. Wurden die Milzzellen über Glasperlen-Säulen fraktioniert, so nahm die Interferon-Produktion nämlich ab, während die mitotische Antwort auf die Stimulantien drastisch zunahm. Wurden die so fraktionierten Lymphozyten weiter über Nylonwoll-Säulen gereinigt, unterblieb die Interferon-Produktion völlig, wohingegen der Thymidin-Einbau in den stimulierten Kulturen unverändert hoch war. Die Interferon Synthese konnte, ähnlich wie es auch von uns beobachtet wurde, durch Zusatz von Knochenmarks- oder Milzmakrophagen wiederhergestellt werden. Demgegenüber hatten Makrophagen, die aus Proteose-Pepton-induzierten Peritonealexsudaten stammten, keinen Effekt, was möglicherweise durch eine ungenügende Exprimierung der B-L-Antigene bedingt war (Cowing et al., 1978).

Unsere Beobachtungen haben deutlich gemacht, daß die Höhe des Lymphokin-Gehaltes zellfreien Mediums kultivierter Lymphozyten des Huhnes von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren abhängig ist.

Zellfreies Medium kultivierter Thymuslymphozyten besaß ausschließlich nach ConA-Stimulierung Zytostase-induzierende und antivirale Aktivitäten. Die höchsten Lymphokin-Gehalte pro ml Kulturmedium ließen sich in den Überständen jener Thymuslymphozytenkulturen messen, die aus Thymuszellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert und sodann nach Stimulierung mit 30µg ConA pro ml Medium für 72 Stunden bei 41°C

und in einer Konzentration von $2x10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium (3% FKS, 2% HüS) bebrütet worden waren. Eine Kultivierung in serumfreiem Medium führte zu einer deutlichen Verringerung der Lymphokin-Ausbeute.
Serumfreies Medium ConA-stimulierter Milzlymphozyten besaß bei einer Zelldichte von $0,5x10^7$ Zellen pro ml die höchste Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit und antivirale Aktivität, wenn die Lymphozyten mit 2,5µg ConA pro ml stimuliert worden waren.
Bei $1x10^7$ Zellen pro ml waren in serumfreiem Kulturmedium 7,5µg ConA pro ml und bei $2x10^7$ Zellen 15µg ConA pro ml für eine maximale Lymphokin-Produktion erforderlich.
Wurden die Zellen in serumhaltigem Medium inkubiert, so konnten in den Kulturüberständen ConA-stimulierter Lymphozyten, unabhängig von der Zelldichte, die höchsten Lymphokin-Aktivitäten gemessen werden, wenn die Zellen mit 45µg ConA pro ml stimuliert worden waren.
Für diese Versuche wurden die Milzlymphozyten jeweils aus Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g fraktioniert. Eine Fraktionierung von Milz- oder auch Thymuszellsuspensionen über Ficoll-Hypaque-Gradienten führt zwar zu reineren Lymphozytenpräparationen als die sogenannte Standardfraktionierung (Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g)(Lee, 1974; Hovi et al., 1978), jedoch ist die Lymphokin-Produktion derart gewonnener Lymphozytenkulturen deutlich erniedrigt. Dies ist vermutlich durch einen geringeren Anteil akzessorischer Zellen in den Ficoll-Hypaque-fraktionierten Lymphozytenkulturen bedingt. Aber auch ein toxischer Einfluß des Gradienten-Mediums auf die Lymphozyten wird diskutiert (Lee, 1974; Hovi et al., 1978).

Mit der vorliegenden Arbeit wird erstmalig eine ausführliche Darstellung der in-vitro-Produktion der beiden Lymphokine MAF und IFN-γ durch Lymphozyten des Huhnes gegeben. Die von uns im Hinblick auf eine Mitogen-Stimulierung der Thymus- bzw. Milzlymphozyten als optimal gefundenen Kulturbedingungen sind dabei nur bedingt mit Angaben anderer Autoren vergleichbar, da in deren Untersuchungen die optimalen Kultivierungsbedingungen über-

wiegend auf einen ^{3}H-Thymidin-Einbau bezogen wurden (Kirchner und Oppenheim, 1972; Altman und Kirchner, 1972; 1974; Maheswaran und Thies, 1975; Miggiano et al., 1976; Hovi et al., 1978; Schnetzler et al., 1983; Vainio und Ratcliffe, 1984), der aber, wie bereits ausgeführt, nicht notwendigerweise mit einer Lymphokin-Produktion einhergehen muß (Neumann und Sorg, 1977; Wietzerbin et al., 1978).

Gleichwohl können gewisse Parallelen zu den Ergebnissen von Untersuchungen anderer Autoren, zumindest hinsichtlich der Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur der Lymphozyten beobachtet werden. So besitzen nämlich Überstände kultivierter ConA-stimulierter Thymus- oder Milzlymphozyten des Huhnes nach einer 72-stündigen Bebrütung der Zellkulturen bei 41°C nicht nur die höchsten MAF- und IFN-γ-Aktivitäten, wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, sondern die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation der Lymphozyten erreicht gleichzeitig ein Maximum (Kirchner und Oppenheim, 1972; Maheswaran und Thies, 1975; Lee, 1984). Eine vorherige Fraktionierung der Lymphozyten aus Thymus- oder Milzzellsuspensionen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 30 x g scheint hierfür die optimale Voraussetzung zu bieten. Dies konnte auch in anderen Untersuchungen bestätigt werden (Lee, 1974).

Hinsichtlich weiterer Kultivierungsparameter, wie ConA-Dosis, Serumgehalt oder Zellzahl der Kulturen, finden sich sehr unterschiedliche Angaben bei den einzelnen Autoren. Variationen bezüglich der optimalen ConA-Dosis sind vermutlich durch verschiedene Reinheitsgrade der jeweils zur Lymphozyten-Stimulierung verwendeten ConA-Präparationen bedingt (Griswold et al., 1983).

Die von verschiedenen Autoren in serumhaltigen Lymphozytenkulturen beobachtete Förderung oder auch Hemmung einer Mitogen-induzierten Proliferation und Lymphokin-Produktion von T-Lymphozyten ist vermutlich durch Herkunft und Menge des zugesetzten Serums bedingt und läßt sich mit unterschiedlichen Gehalten dieser Seren an α-Globulin-assoziierten immunregulatorischen Proteinen erklären (Ling und Kay, 1975; Kristensen et al., 1982; Lee, 1984; Thiel und Burkhardt, 1984; Keller und Calvanico, 1984). In unseren Untersuchungen konnten allerdings keine Serum-induzierten, T-Zell-suppressiven Effekte beobachtet werden.

In ConA-stimulierten Thymuszellkulturen wurde die Lymphokin-Aus-

beute durch einen Serum-Zusatz eher erhöht, während sie in ConA-stimulierten Milzzellkulturen nahezu unverändert blieb.
Ein Serum-Zusatz erforderte allerdings bei den Milzzellen im Hinblick auf maximale Lymphokin-Gehalte der Kulturüberstände höhere ConA-Dosierungen als die Kultivierung in serumfreiem Medium, da durch die Serumprotein-Bindung des Mitogens weniger freies ConA verfügbar war (Mose, 1968). Demgegenüber waren in Thymuszellkulturen die jeweils optimalen ConA-Dosen in serumhaltigem und serumfreiem Kulturmedium gleich.
Ling und Kay (1975) sowie Kristensen et al., (1982) führen die nach Serumzusatz in Lymphozytenkulturen häufig festgestellten erhöhten DNA-Synthese-Raten auf antigene Eigenschaften der verwendeten heterologen Seren zurück. Möglicherweise sind derartige Serumwirkungen neben den Effekten des sogenannten α-Globulin assoziierten Proteins, zumindest teilweise, auch für die von uns in nicht Mitogen-stimulierten Milzlymphozytenkulturen beobachtete hohe Lymphokin-Produktion verantwortlich, die nur in Zellkulturen mit serumhaltigem Medium und nur bei Zellzahlen von $1\text{-}2\text{x}10^7$ Zellen pro ml nachzuweisen war. Denn allein mit einer allogenen Stimulierung lassen sich diese Effekte nur unzureichend erklären, da sie nämlich nicht nur in Mischkulturen von Milzlymphozyten mehrerer Spender-Tiere auftraten, sondern ebenfalls in Milzlymphozytenkulturen beobachtet werden konnten, die getrennt nach Spender-Tieren angelegt worden waren, auch wenn sie hier nicht so ausgeprägt waren.
Die großen Variationen in den Lymphokin-Gehalten der Überstände von Milzlymphozytenkulturen unterschiedlicher Zellspender machen zugleich die erheblichen individuellen Unterschiede deutlich, die in der Fähigkeit von Lymphozyten verschiedener Tiere zur Lymphokin-Produktion bestehen. Derartige Schwankungen zwischen den Immunreaktivitäten einzelner Individuen konnten auch beim Säuger beobachtet werden (Ling und Kay, 1975; Kristensen et al., 1982). Sie sind bei immunmodulatorischen Untersuchungen an Einzeltieren durch Zusammenstellung entsprechend großer Versuchs- und Kontrollgruppen zu berücksichtigen.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der von uns untersuchten Lymphokin-Präparationen unterschieden sich zum Teil erheblich voneinander. Zwar waren die Zytostase-induzierenden und die antiviralen Aktivitäten säure- und hitzeempfindlich, jedoch ging ihre biologische Wirksamkeit durch derartige chemisch-physikalische Behandlungen nicht vollständig verloren. Die Zytostase-induzierende Wirksamkeit und die antivirale Aktivität der untersuchten Kulturüberstände wurden vielmehr in unterschiedlich hohem Maße reduziert, je nachdem unter welchen Bedingungen die Lymphokine gewonnen worden waren.
Die antivirale Aktivität ConA-induzierten Interferons, welches von nach Zellspendern getrennt inkubierten und in serumfreiem Medium kultivierten Milzlymphozyten produziert wurde, ließ sich durch Säure- und Hitze-Behandlung um über 90% reduzieren. Dieses Interferon zeigte damit Eigenschaften, die für das IFN-γ des Säugers charakteristisch sind (Wheelock, 1965; Epstein, 1977; Langford et al., 1979).
Demgegenüber wurde die antivirale Wirkung anderer Lymphokin-Präparationen, die aus Mischkulturen nicht Mitogen-stimulierter Milzlymphozyten mehrerer Spender-Tiere stammten, durch eine derartige Behandlung um lediglich 41-51% reduziert. Die IFN-Aktivität von Überständen entsprechender, nun aber ConA-stimulierter Milzlymphozyten-Mischkulturen verringerte sich durch die beschriebene Säure- bzw. Hitze-Behandlung um 62-69%.
Es wäre nach diesen Resultaten denkbar, daß die untersuchten Lymphokin-Präparationen neben IFN-γ auch unterschiedlich hohe Anteile von säure- und hitzestabilem IFN-α oder IFN-ß enthielten. Derartige Interferone sind allerdings, verglichen mit ihrer antiviralen Aktivität, bei der Aktivierung von Hühnermakrophagen weit weniger wirksam als IFN-γ (Bülow et al., 1984).

Die vorliegenden Untersuchungen haben deutlich gemacht, daß Makrophagen nicht nur einseitig ausgerichtete Effektorzellen sind, sondern regulatorische Zellen mit sehr komplexen Kapazitäten, die auf vielfältige Weise zur Immunreaktion beitragen. Zu ihren wichtigsten Eigenschaften gehört jedoch die Fähigkeit, körperfremde oder veränderte körpereigene Strukturen, wie Mikroorganismen, geschädigte Zellen oder denaturierte, aggregierte Proteine aufzunehmen und den Zellen des lymphatischen Apparates in geeigneter Form zu präsentieren. In dieser Funktion sind die Makrophagen für die Integrität eines Organismus von außerordentlicher Bedeutung (Allen und Unanue, 1984).
Zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Phagozytoseleistung in vitro sind zahlreiche Methoden entwickelt worden, mit denen meist, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die Ingestionsrate verschiedener Partikel bestimmt wird. Nun dient die Beurteilung des Phagozytoseverhaltens kultivierter Makrophagen nicht nur der Identifizierung dieser Zellen, sondern sie erlaubt gleichzeitig eine Charakterisierung ihres Funktionszustandes. Dabei zeichnen sich aktivierte Makrophagen zumeist durch eine erhöhte Phagozytoserate gegenüber Mikroorganismen aus (Mackaness, 1970). Die Veränderungen der phagozytischen Aktivität sind jedoch im Einzelfall von den zur Aktivierung der Makrophagen eingesetzten Induktoren abhängig. Aber auch das zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität verwendete Testsystem ist für eine Aussage über ein verändertes Phagozytoseverhalten der Zellen von großer Bedeutung. Welche Rolle in diesem Zusammenhang die Eigenschaften der zur Phagozytose angebotenen Partikel haben können, wird am eindrucksvollsten durch die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dokumentiert.
Während unbehandelte und bei geringer Flächendichte kultivierte Knochenmarksmakrophagen des Huhnes überwiegend nicht in der Lage waren, vitale Candida albicans aufzunehmen, führte eine Hitzeinaktivierung der Candida-Zellen zu einer grundlegenden Änderung ihrer Phagozytierbarkeit, mit dem Resultat, daß sie nun von Makrophagen derselben Population, jeweils deren Fassungsvermögen entsprechend, in hoher Zahl aufgenommen werden konnten.
Da die Art der hier vorgenommenen Hitzeinaktivierung eine Änderung der Zellwandstruktur von C.albicans zur Folge hat, lassen diese Ergebnisse vermuten, daß die Phagozytose vitaler und hitzeinak-

inaktivierter C.albicans durch verschiedene Mechanismen erfogt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß aktivierender Behandlungen auf die sogenannte unspezifische Phagozytose vorzugsweise vitaler,aber auch hitzeinaktivierter Candida albicans durch kultivierte Hühnermakrophagen untersucht werden.
Um jeglichen Einfluß opsonierender Serumbestandteile auf die Phagozytose der Hefezellen ausschließen zu können, wurde das serumhaltige Kulturmedium der für diese Versuche verwendeten Makrophagenkulturen jeweils vor Versuchsbeginn abgesaugt und die Zellkulturen anschließend mehrfach mit serumfreiem Medium gespült. Sie wurden schließlich für weitere 60 Minuten in serumfreiem Medium inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zu bieten, mittels ihrer hohen endozytischen Aktivität verbliebene und bereits an die Phagozytenmembran gebundene Serumreste aufzunehmen. Erst dann wurden nach erneutem Absaugen des Mediums die Phagozytoseversuche durchgeführt.
Unter diesen Bedingungen konnte als Erklärung für die anfänglich scheinbar schlecht reproduzierbaren Ergebnisse ein Zusammenhang zwischen der Flächendichte der Makrophagen und ihrem Phagozytoseverhalten gegenüber vitalen Candida albicans beobachtet werden. Und zwar waren sowohl die Phagozytosekapazität der untersuchten unbehandelten Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen als auch deren Phagozytoseaktivität bei konstanter Kultivierungsdauer von der Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit abhängig. Makrophagenkulturen mit besonders hohen Flächendichten der Zellen (375 Zellen pro mm^2 und mehr) zeichneten sich durch ebenfalls stark erhöhte mittlere Phagozytoseaktivitäten und -kapazitäten aus. Gleichzeitig wiesen sie deutliche morphologische Anzeichen einer Aktivierung auf. Die Unterschiede im Phagozytoseverhalten von Knochenmarks- oder Peritonealmakrophagen wurden nicht nur zwischen verschieden dicht angesetzten Makrophagenkulturen beobachtet, sondern sie traten sogar in ein und derselben Zellkultur auf, wenn Bereiche unterschiedlicher Flächendichte getrennt voneinander ausgewertet wurden. Um überhaupt reproduzierbare Ergebnisse zu ermöglichen, erwies es sich daher als notwendig, die Zelldichte der Makrophagenkulturen zu standardisieren. Nun hatte

sich in Vorversuchen gezeigt, daß bei niedrigen Flächendichten der Einfluß aktivierender Behandlungen auf die Phagozytosetätigkeit der Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen am deutlichsten ausgeprägt war. Aus diesem Grunde wurde die Flächendichte auf 125 Zellen pro mm^2 begrenzt. Eine weitere Verringerung der Zellzahl pro Flächeneinheit führte zu keiner weiteren Abnahme der Phagozytosetätigkeit der Makrophagen.
Da aber selbst in Kulturen mit standardisierten Zellzahlen die Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit gewissen Schwankungen unterlag, wurden immer nur jene Bereiche der Zellkulturen ausgewertet, welche der geforderten Flächendichte entsprachen.

Ähnliche, mit der Flächendichte der Makrophagen in Zusammenhang stehende funktionelle Veränderungen, konnten auch von anderen Autoren beobachtet werden. Peck et al. (1982) stellten bei in vitro ausgereiften Blutmonozyten des Huhnes eine Zunahme der Phagozytosekapazität um etwa 90% fest, wenn die adhärenten Zellen zuvor für 1 Woche bei einer hohen Flächendichte (10^6 Zellen pro 60mm - Petrischale) inkubiert worden waren. Die Autoren machen jedoch keinerlei Angaben zur Versuchsdurchführung.
Eine spontane Zytotoxizität besonders dichter, ebenfalls aus Blutmonozyten des Huhnes ausgereifter Makrophagenkulturen beschrieb Klasen (1983). Er sah hierin den Ausdruck einer unspezifischen Aktivierung der Makrophagen. Dafür sprach nach seinen Untersuchungen die Beobachtung, daß Makrophagen in dichten Kulturen regelmäßig deutliche morphologische Anzeichen einer Aktivierung zeigten. Klasen (1983) ging jedoch nicht näher auf etwaige Ursachen dieser Aktivierung ein.

Eine mögliche Erklärung für den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen und auch von anderen Autoren in Hühnermakrophagenkulturen beobachteten Einfluß der Flächendichte der Zellen auf ihren Funktionszustand geben verschiedene Untersuchungen, die jedoch beim Säuger durchgeführt wurden. So konnten Kurland et al. (1978) und Pelus et al. (1979) zeigen, daß Makrophagenkulturen mit zunehmender Zellzahl pro Flächeneinheit steigende Mengen eines colony-stimulating-factor (CSF) freisetzen.

Die CSF-Aktivitäten nahmen jedoch wieder deutlich ab, wenn eine, im Hinblick auf die Kolonie-Bildung optimale Flächendichte der CSF-produzierenden Makrophagen überschritten wurde. Parallel zur kontinuierlichen, durch Indomethazin-Zusatz hemmbaren Abnahme der CSF-Aktivitäten waren dann gleichzeitig wachsende Mengen an Prostaglandin E (PGE) im Medium der Makrophagenkulturen nachweisbar, wobei das freigesetzte PGE die CSF-Wirkung in einer Art Rückkopplungsmechanismus antagonisierte. Die PGE-Produktion durch Monozyten bzw. Makrophagen ist wiederum abhängig vom Grad ihrer Stimulierung (Kurland und Bockman, 1978).
Wenn auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein CSF- oder PGE-Nachweis nicht geführt werden konnte, so geben doch die für den Säuger beschriebenen Zusammenhänge Anlaß zu der Vermutung, daß auch kultivierte Makrophagen des Huhnes ohne weitere Stimulierung CSF-Aktivitäten in das Kulturmedium abgeben, wobei die freigesetzten Mengen bei hohen Flächendichten der Zellen offensichtlich ausreichen, um die funktionelle Aktivität der Makrophagen zu erhöhen. Die gesteigerte Aktivität kann sich dann, wie in den Ergebnissen dieser Untersuchung dargestellt wurde, in einer Zunahme der Phagozytoseaktivität und -kapazität unbehandelter Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen gegenüber vitalen Candida albicans ausdrücken.
Ob diese vermehrte Aufnahme der Hefezellen nun durch eine erhöhte Verfügbarkeit eines Mannose-Rezeptors vermittelt wurde, der an der Phagozytose von C.albicans durch Hühnermakrophagen beteiligt sein soll (Rossi und Weiler, 1982; Rossi und Himmelhoch, 1982; Rossi et al., 1983), oder nicht vielmehr, wie bei der Maus, durch Ausschüttung makrophageneigener Faktoren mit opsonierender Wirkung, wie Komplement (Ezekowitz et al., 1983; Hartung und Hadding, 1983), muß in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.
Da Makrophagen sekretorisch sehr aktive Zellen sein können, wäre ebenso denkbar, daß die vitalen Hefezellen durch makrophageneigene und erst bei hohen Flächendichten vermehrt sezernierte Faktoren, wie z.B. Enzyme, geschädigt und damit auch erst für die Makrophagen phagozytierbar werden.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Phagozytoseversuchen wurden Makrophagenkulturen nur bis zu einer Flächendichte von 375 Zellen pro mm^2 untersucht, so daß sich nicht sagen läßt, ob eine weitere Erhöhung der Flächendichte unbehandelter Makrophagen wieder zu einer Hemmung der Phagozytosetätigkeit geführt hätte, wie es Oropeza-Rendon et al. (1979) bei der Maus beobachten konnten.

Aktivierende Behandlungen führen fast immer zu den gleichen oder zumindest doch sehr ähnlichen morphologischen Veränderungen, während sie verschiedenartige Funktionen sowohl zu hemmen als auch zu steigern vermögen (Karnovsky und Lazdins, 1978).
Dies zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Arbeit bei den Untersuchungen über das Phagozytoseverhalten kultivierter Hühnermakrophagen gegenüber vitalen C.albicans.
In Knochenmarksmakrophagen-Kulturen induzierten Lymphokin-haltige Überstände von kultivierten ConA-stimulierten Thymuszellen, aber auch Lymphokin-haltige Überstände kultivierter Milzzellen eine eindrucksvolle Steigerung der Phagozytoseaktivität und -kapazität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen.
Demgegenüber nahm bei Peritonealmakrophagen erst mit fallendem Lymphokin-Gehalt der zur Behandlung verwendeten Thymuszellkulturüberstände die Phagozytosetätigkeit zu .
Sowohl die Peritoneal- als auch die Knochenmarksmakrophagen zeigten jedoch nach der Lymphokin-Behandlung deutliche morphologische Veränderungen, wie sie auch als Ausdruck einer Aktivierung auftreten können.
Allerdings erschienen die Peritonealmakrophagen im phasenkontrastmikroskopischen Bild wesentlich abgeflachter als die Knochenmarksmakrophagen. Zwar waren beide deutlich vergrößert, jedoch besaßen die Peritonealmakrophagen einen breiten und zugleich strukturarmen Zytoplasmasaum, der in dieser deutlichen Ausprägung in den Knochenmarksmakrophagen-Kulturen nicht beobachtet werden konnte. Andererseits waren Knochenmarksmakrophagen nach einer 48-stündigen Lymphokin-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auffallend vakuolisiert, während sich bei Peritonealmakrophagen selbst nach einer 96-stündigen Lympho-

kin-Behandlung eine deutliche Vakuolisierung nur im perinukleären Bereich entwickelte.
Nun handelte es sich bei den innerhalb der Phagozytoseversuche eingesetzten Peritonealmakrophagen nicht um die sogenannten residenten Makrophagen der Bauchhöhle, sondern um eine heterogene Makrophagenpopulation, die nach Proteose-Pepton-Induzierung gewonnen worden war. Von Untersuchungen beim Säuger ist aber andererseits bekannt, daß derartig stimulierte Zellen, je nach Grad ihrer Stimulierung, unterschiedlich große Mengen an PGE sezernieren (Kurland und Bockman, 1978). Oropeza-Rendon et al. (1979) beobachteten, daß PGE_1 in Makrophagenkulturen der Maus deutliche morphologische Veränderungen induziert, so daß die Zellen bereits 20 Minuten nach PGE_1-Gabe deutlich abgeflachter sind und eben den, auch von uns beobachteten, äußerst breiten, aber strukturarmen Zytoplasmasaum zeigen. Parallel zu den morphologischen Veränderungen beobachteten Oropeza-Rendon et al. (1979) eine Abnahme der Phagozytose von Zymosan-Partikeln, für die möglicherweise derselbe Phagozytosemechanismus Bedeutung hat, wie für die Aufnahme vitaler C.albicans.
Diese Parallelen zwischen den Ergebnissen von Untersuchungen anderer Autoren und den eigenen Beobachtungen geben Anlaß zu der Vermutung, daß auch die bei den Peritonealmakrophagen des Huhnes, in diesem Falle aber nach Lymphokin-Behandlung aufgetretenen funktionellen und morphologischen Veränderungen durch PGE vermittelt worden sein könnten. Dabei könnte das PGE sowohl endogener Herkunft sein, als auch exogen mit den Lymphokin-haltigen Kulturüberständen zugeführt worden sein. Für eine exogene PGE-Zufuhr sprechen die Ergebnisse von Ferraris et al. (1974), die nämlich zeigen konnten, daß ConA-stimulierte Lymphozyten der Maus steigende Mengen an PGE ins Kulturmedium abgeben, während Medium unstimulierter Lymphozytenkulturen kein PGE enthält (Kurland et al., 1978). Die Unterschiede im Phagozytoseverhalten von Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen würden sich dann daraus erklären, daß bei Proteose-Pepton-stimulierten Peritonealmakrophagen eine weitere stimulierende oder aktivierende Behandlung mit Lymphokinen zu einem, möglicherweise PGE-vermittelten, Überschreiten eines kritischen Stimulierungs-Potantials führt und die Zellen refraktär gegenüber einer weiteren Stimulierung werden, um nicht ihre Lebensfähigkeit einzubüßen.

Bei den Lymphokin-Präparationen, die in unseren Experimenten für die Aktivierung von Makrophagen verwendet wurden, handelte es sich um Kulturüberstände von unter verschiedenen Bedingungen kultivierten und zum Teil mit ConA stimulierten Thymus- und Milzlymphozyten des Huhnes. Es ist von Untersuchungen beim Säuger bekannt, daß derartige Kulturüberstände eine Vielzahl unterschiedlicher Lymphokin-Aktivitäten enthalten (Fitch et al., 1983; Bödeker et al., 1984). Über deren mögliche Wechselwirkungen hinsichtlich der Induzierung bestimmter biologischer Wirkungen herrscht allerdings noch weitgehend Unklarheit (Falk und Männel, 1983; Männel und Falk, 1983). Aus diesem Grunde kann nicht eindeutig entschieden werden, ob die ausgeprägten morphologischen und funktionellen Veränderungen Lymphokin-aktivierter Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen tatsächlich auf die Wirkung einzelner Lymphokine wie MAF bzw. IFN-γ zurückzuführen sind, oder ob nicht vielmehr andere Substanzen, wie der colony-stimulating-factor (CSF), dafür verantwortlich waren. Für eine Beteiligung des CSF sprechen nicht nur seine Rolle bei der durch zunehmende Flächendichten der Makrophagen induzierten verstärkten Phagozytosetätigkeit dieser Zellen, sondern noch weitere Resultate dieser Arbeit. Denn sowohl eine Behandlung mit zellfreiem Medium kultivierter Hühnerembryofibroblasten als auch die entsprechend lange Einwirkung eines Überstandes kultivierter Kükennierenzellen induzierten eine verstärkte Phagozytosetätigkeit der Makrophagen. Kulturüberstände nicht stimulierter Thymuslymphozytenkulturen besaßen dieses Phagozytosesteigernde Potential ebenso wie zellfreies Medium konfluenter Knochenmarksmakrophagenkulturen. In keiner der vier Mediumarten konnten jedoch mit unseren Nachweismethoden Zytostase-induzierende oder antivirale Aktivitäten gemessen werden.

Dies alles zeigt eigentlich, daß es sich bei dem wirksamen Prinzip der genannten Kulturüberstände nicht um einen speziell von immunkompetenten Zellen produzierten Mediator handeln kann. Es liegt vielmehr die Vermutung nahe, daß die beobachtete Beeinflussung der Phagozytoseaktivität und -kapazität kultivierter Makrophagen durch einen CSF-ähnlichen Faktor induziert wurde. Kurland et al. (1978) konnten einen solchen Faktor, der zwar keine Kolonie-Bil-

dung stimulierte, aber die Cluster-Formation von Knochenmarksmakrophagen in Weich-Agar förderte, in Überständen unstimulierter, aus menschlichem Blut gewonnener Lymphozytenkulturen nachweisen. Stanley und Heard (1977) sowie Stanley (1981) zeigten, daß Fibroblasten einen colony-stimulating-factor freisetzen, der sowohl eine Proliferation, wie auch eine Differenzierung von Makrophagen zu induzieren vermag.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der Phagozytoseversuche dafür, daß die beiden Parameter "Phagozytoseaktivität" und "Phagozytosekapazität" als Hilfsmittel zur Charakterisierung von Lymphokinen ungeeignet sind. Letztlich wird nämlich gezeigt, daß es eher nicht die Lymphokine wie MAF und IFN-γ sind, die eine Steigerung der Phagozytosetätigkeit in Knochenmarksmakrophagen induzieren und einen entsprechenden, mit steigendem Lymphokin-Gehalt der Überstände einhergehenden, abnehmenden Einfluß auf die Phagozytosetätigkeit von Peritonealmakrophagen haben. Diese Effekte scheinen vielmehr auf das Vorhandensein eines colony-stimulating-factor in mehr oder weniger hohen Konzentrationen bzw. auf das Wirken eines CSF-ähnlichen Faktors zurückzuführen zu sein, wie er auch in Überständen von konfluenten HEF-, KN- und KM-Kulturen enthalten sein könnte.

Abschließend stellt sich die Frage, inwieweit die experimentellen Versuchsansätze auf die Gegebenheiten im lebenden Tier übertragbar sind. Unsere Untersuchungen lassen in diesem Punkt durchaus einen Rückschluß auf die Situation in vivo zu. Makrophagen stellen im gesunden Gewebe ruhende Zellen mit niedriger Stoffwechselaktivität dar (Steinman und Cohn, 1975; Takemura und Werb, 1984). Allerdings ist ihre Populationsdichte im gesunden Gewebe auch so gering, daß ihnen eine effektive Auseinandersetzung mit Mikroorganismen oder Noxen anderer Art nicht möglich wäre (van Furth und Willemze, 1979). Erst im Rahmen von Entzündungsprozessen kommt es unter Vermittlung immunregulatorischer Mediatoren (Lymphokine, Zytokine und Monokine) zu einer Anreicherung und lokalen Zellkonzentrierung der Makrophagen (Spector, 1970; Spector und Ryan, 1970; Dannenberg, 1975;

Bitterman et al., 1984). Es erscheint durchaus einleuchtend, daß unter diesen Bedingungen die funktionelle Aktivität der Makrophagen gesteigert wird, so wie es im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch unabhängig von einer Lymphokin-Wirkung bei hohen Flächendichten der Makrophagen in vitro beobachtet werden konnte.
Diese gesteigerte Aktivität findet in vivo häufig ihr morphologisches Korrelat in einem gehäuften Auftreten mehrkerniger Riesenzellen, die sich auch in unseren in vitro-Versuchen durch Lymphokin-Behandlung in Knochenmarksmakrophagen-Kulturen induzieren ließen.
So verfügt der Makrophage anscheinend über mindestens einen autonomen Aktivierungsmechanismus, der es ihm gestattet, selbst bei einem Ausfall des Lymphokin-produzierenden Systems, seine Funktionen innerhalb der immunologischen Abwehrreaktion eines Organismus wahrzunehmen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Gewinnung und funktionellen Charakterisierung von Lymphokinen aus Hühner-Lymphozytenkulturen wurde zellfreies Medium unterschiedlich aufbereiteter und unter verschiedenen Bedingungen kultivierter Thymus-, Milz- und Bursazellen untersucht.
Die biologische Wirksamkeit der Lymphokin-Präparationen wurde an Hand ihrer antiviralen Aktivität sowie der Fähigkeit zur Induzierung zytostatischer Eigenschaften kultivierter Knochenmarksmakrophagen quantitativ erfaßt. Die Makrophagen-aktivierende Wirksamkeit der Lymphokin-Präparationen, gemessen an ihrer 50% Zytostase-induzierenden Dosis (ZID), war eng mit deren antiviraler Aktivität (Interferon(IFN)-Einheiten) verbunden. Während in Überständen kultivierter Thymuszellen ausschließlich nach Stimulierung mit Concanavalin A (ConA) derartige Lymphokin-Aktivitäten nachzuweisen waren, gaben kultivierte Milzzellen bei Ansätzen in relativ hoher Dichte ($1\text{-}2\times10^7$ Zellen pro ml) auch ohne Mitogen-Behandlung ZID- und IFN-Aktivitäten in das Kulturmedium ab. Der vergleichsweise höchste Lymphokin-Gehalt wurde im Medium von Lymphozytenkulturen erreicht, die nach Zusatz einer jeweils optimalen ConA-Dosis für 72 Stunden bei 41°C bebrütet worden waren. Für Thymuslymphozyten betrug die optimale ConA-Dosis unabhängig vom Serumgehalt und von der Zelldichte in den Kulturen 30µg ConA pro ml. Im Gegensatz dazu war bei Milzlymphozyten die optimale ConA-Dosis sowohl vom Serumgehalt des Kulturmediums als auch von der Zelldichte abhängig und schwankte zwischen 2,5µg ConA ($0,5\times10^7$ Zellen pro ml in serumfreiem Medium) und 45µg ConA pro ml ($0,5\text{-}2\times10^7$ Zellen pro ml in serumhaltigem Medium). Kultivierte Bursazellen gaben auch nach ConA-Behandlung weder ZID- noch IFN-Aktivitäten in das Kulturmedium ab.
Über Nylonfaser-Säulen fraktionierte Milzzellpopulationen produzierten keine Lymphokine, aber ihre Fähigkeit zur Lymphokin-Bildung ließ sich durch Zusatz von 5% autologen Milzmakrophagen wiederherstellen. Die Lymphokin-Produktion war demnach offensichtlich von der Anwesenheit einer ausreichenden Anzahl akzessorischer Zellen abhängig.
ConA-induziertes Lymphozyten-Interferon von serumfreien Milzzellkulturen wurde aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaf-

ten als IFN-γ eingestuft. Zellfreies Medium von serumhaltigen Milzlymphozytenkulturen enthielt dagegen bei Zelldichten von $1-2x10^7$ Zellen pro ml außerdem säure- und hitzestabiles Interferon, vermutlich IFN-α oder IFN-ß.

Art und Umfang der Beeinflussung des Phagozytoseverhaltens kultivierter Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen gegenüber vitalen und hitzeinaktivierten Candida albicans dienten als zusätzliche Parameter zur funktionellen Charakterisierung der in den Lymphokin-Präparationen enthaltenen Mediatoren. Unterschiede hinsichtlich der Phagozytoseaktivität und -kapazität zwischen behandelten und unbehandelten Makrophagen waren in hohem Maße von der Anzahl adhärenter Makrophagen pro Flächeneinheit abhängig; sie kamen bei Zellzahlen bis zu 125 Makrophagen pro mm^2 am deutlichsten zum Ausdruck.
Lymphokin-Präparationen mit hohen ZID- und IFN-Aktivitäten induzierten in Knochenmarksmakrophagen-Kulturen eine eindrucksvolle Steigerung der mittleren Phagozytoseaktivität und -kapazität, beeinflußten jedoch nicht die phagozytische Aktivität von Peritonealmakrophagen. Demgegenüber steigerten Zellkulturüberstände ohne nachweisbare ZID- oder IFN-Aktivitäten, wie Medium von Hühnerembryofibroblasten- oder Kükennierenzellkulturen die Phagozytosetätigkeit sowohl von Peritoneal- als auch von Knochenmarksmakrophagen. Es wird daher vermutet, daß die Veränderungen im Phagozytoseverhalten behandelter Makrophagen weniger durch bestimmte Lymphokine bewirkt wurden, sondern vielmehr durch andere Zytokine, wie etwa den Kolonie-stimulierenden Faktor.

G. SUMMARY

Chicken thymus, spleen, and bursa lymphocytes were isolated by different methods and incubated under differing conditions in order to obtain and characterize avian lymphokines. The biological activity of lymphokine-containing cell culture supernatants was measured by their antiviral activity and by their capacity to induce cytostatic effects in bone-marrow-derived macrophages.

The macrophage-activating capacity of lymphokine preparations (50% cytostasis-inducing dose, CID) was closely related with their antiviral activity (interferon(IFN)-units). Lymphokine production by thymus lymphocytes required concanavalin A (ConA)-stimulation, while spleen cells, when cultured at high density ($1\text{-}2\times10^7$ cells/ml), released CID and IFN activities into the culture medium even without mitogen-stimulation. By way of comparison, the highest lymphokine content was found in the supernatant of lymphocyte cultures, which were incubated for 72 hours at 41°C after stimulation with an optimal ConA dose. For stimulation of thymus lymphocytes 30µg ConA per ml were found to be optimal, independent of serum content and cell density in the cultures. In contrast, the optimal ConA dose for spleen lymphocytes not only depended on the serum content but also on the cell density in the cultures and varied within a range of 2,5µg ConA ($0{,}5\times10^7$ cells/ml in serum-free medium) and 45µg ConA per ml ($0{,}5\text{-}2\times10^7$ cells/ml in serum-containing medium). Cultured bursa cells released neither CID nor IFN activities into the culture medium, even after ConA-treatment.

The ability of spleen cells to produce lymphokines was abrogated by nylonwool-column fractionation but could be restored by adding 5% autologous spleen macrophages. Lymphokine production therefore seemed to be dependent on a sufficient number of accessory cells.

According to its physico-chemical properties, ConA-induced lymphocyte interferon of serum-free spleen cell cultures was considered to be IFN-γ. In contrast, supernatants of serum-containing spleen cell cultures with a cell density of $1\text{-}2\times10^7$ cells per ml may also have contained acid- and heat-resistant IFN-α or IFN-ß.

Qualitiy and quantity of the influence of lymphokine preparations on the phagocytic activity of cultured peritoneal and bone-marrow-derived macrophages towards vital and heat-killed Candida albicans served as additional parameters for a functional characterization of further mediators. Differences concerning the phagocytic activity and capacity between treated and untreated macrophages highly depended on the number of adherent macrophages per area unit; they were most distinct at cell numbers of up to 125 macrophages per mm^2.

Lymphokine preparations with high CID and IFN titres strongly augmented the mean phagocytic activity and capacity in cultures of bone-marrow-derived macrophages, but they did not influence the phagocytic activity of peritoneal macrophages. In contrast, cell culture supernatants without detectable CID or IFN activities, like chicken embryo fibroblast or chicken kidney cell culture conditioned medium increased phagocytic activity not only of bone-marrow-derived macrophages but also of peritoneal macrophages. The presented experimental results strongly suggest that the observed changes in phagocytic activity of treated macrophages were less induced by special lymphokines but more by other cytokines, e.g. the colony stimulating factor.

H. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, D.O. (1979): Macrophages.
in: JACOBY, W.B. and PASTAN, I.H. (edit.): Methods in enzymology. Vol. LVIII.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 494-506.

ADELMAN, N.E., HAMMOND, M.E., COHEN, S. and DVORAK, H.F. (1979): Lymphokines as inflammatory mediators.
in: COHEN, S., PICK, E. and OPPENHEIM, J.J. (edit.): Biology of the lymphokines.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 13-58.

ALBINI, B. and WICK, G. (1974): Delineation of B and T lymphoid cells in the chicken.
J. Immunol. 112, 444-450.

ALLEN, P.M. and UNANUE, E.R. (1984): Antigen processing and presentation by macrophages.
Am. J. Anat. 170, 483-490.

ALLISON, A.C. and DAVIES, P. (1974): Mononuclear phagocyte activation in some pathological processes.
in: WAGNER, W.H. and HAHN, H. (edit.): Activation of macrophages.
Workshop Conferences Hoechst, Vol. II Excerpta Medica Amsterdam, American Elsevier Publishing Inc., New York, pp. 141-156.

ALTMAN, L.C. and KIRCHNER, H. (1972): The production of monocyte chemotactic factor by agammaglobulinemic chicken spleen cells.
J. Immunol. 109, 1149-1151.

ALTMAN, L.C. and KIRCHNER, H. (1974): Mononuclear leucocyte chemotaxis in the chicken. Definition of a phylogenetically specific lymphokine.
Immunology 26, 393-405.

ANDERSSON, J., EDELMAN, G.M., MÖLLER, G. and SJÖBERG, O. (1972): Activation of B-lymphocytes by locally concentrated concanavalin A.
Eur. J. Immunol. 2, 233-235.

ARCHER, D.L., SMITH, B.G., ULRICH, J.T. and JOHNSON, H.M. (1979): Immune interferon induction by T-cell mitogens involves different T-cell subpopulations.
Cell. Immunol. 48, 420-426.

ARMSTRONG, J.A. (1971): Semi-micro, dye-binding assay for rabbit interferon.
Appl. Microbiol. 21, 723-725.

ASCHOFF, L. (1924): Das reticuloendotheliale System.
Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd. 26, 1-118.

ASHMAN, R.F. (1984): Lymphocyte activation.
in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology.
Raven Press, New York, pp. 267-300.

ASPINALL, R.L., MEYER, R.K., GRAETZER, M.A. and WOLFE, H.R. (1963): Effect of thymectomy and bursectomy on the survival of skin homografts in chickens.
J. Immunol. 90, 872-877.

AUSTYN, J.M. and GORDON, S. (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage.
Eur. J. Immunol. 11, 805-815.

BAINTON, D.F. (1980): The cells of inflammation: a general view.
in: WEISSMANN, G. (edit.): Cell biology of inflammation.
Elsevier, North-Holland, New York, pp. 1-26.

BAR-SHAVIT, Z., OFEK, I., GOLDMAN, R., MIRELMAN, D. and SHARON, N. (1977): Mannose residues on phagocytes as receptors for the attachment of Escherichia coli and Samonella typhi.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 455-460.

BARON, S., DIANZANI, F. and STANTON, G.J. (1982): The interferon system - a review to 1982.
Tex. Rep. Biol. Med. 41, 1-715.

BEACHEY, E.H. (1982): Die Adhärenz von Bakterien an Schleimhautoberflächen.
Immun. Infekt. 10, 51-57.

BERZOFSKY, J.A. (1983): Promising clues to reception genes and molecules.
Immunology Today 4, 299-301.

BERZOFSKY, J.A. and BERKOWER, I.J. (1984): Antigen-antibody interaction.
in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology.
Raven Press, New York, 595-644.

BESEDOVSKY, H.O., DEL REY, A.E. and SORKIN, E. (1983): What do the immune system and the brain know about each other?
Immunology Today 4, 342-346.

BIANCO, C., GRIFFIN, F.M.JR and SILVERSTEIN, S.C. (1975): Studies of the macrophage complement receptor: alteration of receptor function upon macrophage activation.
J. Exp. Med. 141, 1278-1290.

BITTERMAN, P.B., SALTZMAN, L.E., ADELBERG, S., FERRANS, V.J. and CRYSTAL, R.G. (1984): Alveolar macrophage replication.
J. Clin. Invest. 74, 460-469.

BLALOCK, J.E. (1984): The immune system as a sensory organ. J. Immunol. 132, 1067-1069.

BLANDEN, R.V. (1968): Modification of macrophage function. J. Reticuloendothel. Soc. 5, 179-202.

BÖDEKER, B.G.D., LEHMANN, J. and MÜHLRADT, P.F. (1980): Production of costimulator and various cytokine activities (CSF, MIF, TRF) in mouse lymphoid cell cultures. Use of a small reactor vessel.
in: DE WECK, A. (edit.): Biochemical characterization of lymphokines.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 113-119.

BÖDEKER, B.G.D., LEHMANN, J., DAMME, J.VAN, KAPPMEYER, H., GASSEL, W.-D., HAVEMANN, K., SCHWULERA, U., RÜHL, F. and MÜHLRADT, P.F. (1984): Production of five human lymphokines (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interferon-γ, interleukin 2, macrophage cytotoxicity factor and macrophage migration inhibitory factor) from ConA stimulated lymphocytes in bioreactors.
Immunobiology 166, 12-23.

BORECKY, L., LACKOVIC, V., BLASKOVIC, D., MASLER, L. and SIKL, D. (1967): An interferon-like substance induced by mannans.
Acta Virol. 11, 264-266.

BOTTAZZO, G.F. (1984): HLA-DR expression as a factor in endocrine autoimmune disorders.
Immunobiology 167, 115.

BØYUM, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 77-89.

BRANCA, A.A. and BAGLIONI, C. (1981): Evidence that types I and II interferons have different receptors.
Nature 294, 768-770.

BRAUN-MUNZINGER, S. (1981): Zur Morphologie und Funktion der Thrombozyten des Haushuhns (Gallus domesticus).
Gießen, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

BRODEUR, E.R. and MERIGAN, T.C. (1975): Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody synthesis in vivo.
J. Immunol. 114, 1323-1330.

BROMBERG, Y. and PICK, E. (1983): Oxidative metabolism of lymphokine activated macrophages - free fatty acids as second messengers of superoxide generation.
in: OPPENHEIM, J.J. and COHEN, S. (edit.): Interleukins, lymphokines, and cytokines.
Academic Press, New York, London, pp. 561-567.

BROOKS, K., YUAN, D., UHR, J.W., KRAMMER, P.H. and VITETTA, E.S. (1983): Lymphokine-induced Ig M secretion by clones of neoplastic B cells.
Nature 302, 825-826.

BÜLOW, V.v. and BIGGS, P.M. (1975): Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays.
Avian Pathol. 4, 133-146.

BÜLOW, V.v. and KLASEN, A. (1983a): Effects of avian viruses on cultured chicken bone-marrow-derived macrophages.
Avian Pathol. 12, 179-198.

BÜLOW, V.v. and KLASEN, A. (1983b): Growth inhibition of Marek's disease T-lymphoblastoid cell lines by chicken bone-marrow-derived macrophages activated in vitro.
Avian Pathol. 12, 161-178.

BÜLOW, V.v. and SCHMID, D.O. (1979): Antigenic characteristics of Marek's disease tumor cells.
Avian Pathol. 8, 265-277.

BÜLOW, V.v., WEILER, H. and KLASEN, A. (1984): Activating effects of interferons, lymphokines and viruses on cultured chicken macrophages.
Avian Pathol. 13, 621-637.

BURGER, D.R., WAGNER, C., McCALL, E. and VETTO, R.M. (1982): Activation of human T cells by antigen presented by HLA-DR compatible endothelial cells.
Immunobiology 163, 112-113.

CARLSON, H.C., SWEENY, P.R. and TOKARYK, J.M. (1968): Demonstration of phagocytic and trephocytic activities of chicken thrombocytes by microscopy and vital staining techniques.
Avian Dis. 12, 700-715.

CASSONE, A., MATTIA, E. and BOLDRINI, L. (1978): Agglutination of blastospores of Candida albicans by Concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall.
J. Gen. Microbiol. 105, 263-273.

CHANDRA, R.K. (1983): Trace elements and immune responses.
Immunology Today 4, 322-325.

CHANDRA, R.K. and NEWBERNE, P.M. (1977): Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions.
Plenum Press, New York.

CHANG, K.-J. and CUATRECASAS, P. (1976): Survey and evaluation of labelling methods and of methods for measuring binding to cells and membrane preparations.
in: BITTIGER, H. and SCHNEBLI, H.P. (edit.): Concanavalin A as a tool.
John Wiley & Sons, London, New York, pp. 173-180.

CHANG, T.W., TESTA, D. KUNG, P.C., PERRY, L., DRESKIN, H.J. and GOLDSTEIN, G. (1982): Cellular origin and interactions involved in γ-interferon production induced by OKT 3 monoclonal antibody.
J. Immunol. 128, 585-589.

CHESNUT, R.W., COLON, S.M. and GREY, H.M. (1982a): Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison.
J. Immunol. 128, 1764-1768.

CHESNUT, R.W., COLON, S.M. and GREY, H.M. (1982b): Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages.
J. Immunol. 129, 2382-2388.

CHESTER, T.J., PAUKER, K. and MERIGAN, T.C. (1973): Suppression of mouse antibody producing spleen cells by various interferon preparations.
Nature 246, 92-94.

CHI, D.S., GALTON, J.E. and THORBECKE, J. (1981): Role of T-cells in immune responses of the chicken.
in: ROSE, M.E., PAYNE, L.N. and FREEMAN, B.M. (edit.): Avian immunology.
British Poultry Science Limited, Clark Constable Limited, Edinburgh, pp. 135-165.

CHIRIGOS, M.A., SCHULTZ, R.M. and STYLOS, W.A. (1980): Interaction of interferon, macrophage and lymphocyte tumoricidal activity with prostaglandin effect.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 350, 91-101.

CHU, E., UMETSU, D., LAREAU, M. SCHNEEBERGER, E. and GEHA, R.S. (1984): Analysis of antigen uptake and presentation by Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid B cells.
Eur. J. Immunol. 14, 291-298.

CLINE, M.J. and SWEET, V.C. (1968): The interaction of human monocytes and lymphocytes.
J. Exp. Med. 128, 1309-1325.

COHEN, N. (1983): Some thoughts about the possible early phylogeny of MHC-restriction.
Devel. Comp. Immunol. 7, 775-780.

COHEN, S. (1983): Lymphokines: past, present, and future.
in: OPPENHEIM, J.J. and COHEN, S. (edit.): Interleukins, lymphokines, and cytokines.
Academic Press, New York, London, pp. 753-756.

COHN, Z.A. (1978): The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future.
J. Immunol. 121, 813-816.

COLEMAN, D.L., ROOT, R.K. and RYAN, J.L. (1983): Enhancement of macrophage Fc-dependent phagocytosis by resident thymocytes: effect of a unique heat-stable lymphokine. J. Immunol. 130, 2195-2199.

COOPER, M.D., PETERSON, R.D.A., SOUTH, M.A. and GOOD, R.A. (1966): The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. J. Exp. Med. 123, 75-103.

COWING, C., SCHWARTZ, B.D. and DICKLER, H.B. (1978): Macrophage Ia antigens. I. Macrophage populations differ in their expression of Ia antigens. J. Immunol. 120, 378-384.

CURRIE, G.A. (1978): Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase. Nature 273, 758-759.

DAM, R.H.VAN (1981): Definition and biological significance of the major histocompatibility system (MHS) in man and animals. Vet. Immunol. Immunopathol. 2, 517-539.

DAEMS, W.T. and BREDEROO, P. (1973): Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties, and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the guinea pig. Z. Zellforsch. 144, 247-297.

DAEMS, W.T., KOERTEN, H.K. and SORANZO, M.R. (1976): Differences between monocyte-derived and tissue macrophages. in: REICHARD, S.M., ESCOBAR, M.R. and FRIEDMAN, H. (edit.): The reticuloendothelial system in health and disease. Plenum Press, New York, London, pp. 27-40.

DAEMS, W.T., WISSE, E., BREDEROO, P. and EMEIS, J.J. (1975): Peroxidatic activity in monocytes and macrophages. in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 57-77.

DANNENBERG, A.M.JR. (1975): Macrophages in inflammation and infection. N. Engl. J. Med. 293, 489-493.

DAVID, J.R. (1975): Macrophage activation by lymphocyte mediators. Fed. Proc. 34, 1730-1736.

DAVIES, T.F. (1984): Association of Ia (DR) antigen expression on the normal human thyroid cell with stimulation of autologous T cells. Immunobiology 167, 116.

DEGRE, M. and ROLLAG, H.JR. (1980): Effect of murine interferon on phagocytosis in vitro and in vivo. Ann. N.Y. Acad. Sci. 350, 582-583.

DE MAEYER, E., DE MAEYER-GUIGNARD, J. and MONTAGNIER, L. (1971): Doublestranded RNA from rat liver induces interferon in rat cells.
Nature New Biol. 229, 109-110.

DE MAEYER, E., DE MAEYER-GUIGNARD, J. and VANDEPUTTE, M. (1975): Inhibition by interferon of delayed-type hypersensitivity in the mouse.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1753-1758.

DIAMOND, B., BLOOM, B.R. and SCHARFF, M.D. (1978): The Fc receptors of primary and cultured phagocytic cells studied with homogeneous antibodies.
J. Immunol. 121, 1329-1333.

DIANZANI, F., SALTER, L., FLEISCHMANN, W.R.JR. and ZUCCA, M. (1978): Immune interferon activates cells more slowly than does virus-induced interferon.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 159, 94-97.

DINARELLO, C.A. (1984): Interleukin-1.
Rev. Infect. Dis. 6, 51-95.

DONALDSON, K., BOLTON, R.E., BROWN, D. and DOUGLAS, A. (1984): An improved macrophage spreading assay - a simple and effective measure of activation.
Immunol. Commun. 13, 229-244.

DUMONDE, D.C., WOLSTENCROFT, R.A., PANAYI, G.S., MATTHEW, M., MORLEY, J. and HOWSON, W.T. (1969): Lymphokines: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature 224, 38-42.

DUNCAN, R.L. and MC ARTHUR, W.P. (1978): Partial characterization and the distribution of chicken mononuclear cells bearing the Fc receptor.
J. Immunol. 120, 1014-1020.

DUTTON, R.W. and SWAIN, S.L. (1982): Regulation of the immune response: T-cell interactions.
Crit. Rev. Immunol. 3, 209-261.

EDELMAN, R. and WHEELOCK, E.F. (1966): Vesicular stomatitis replication in human leukocyte cultures: enhancement by phytohemagglutinin.
Science 154, 1053-1055.

EDELSON, P.J. and ERBS, C. (1978): Biochemical and functional characteristics of the plasma membrane of macrophages from BCG-infected mice.
J. Immunol. 120, 1532-1536.

EDELSTON, P.C. (1980): Monocytes and macrophages: aspects of their cell biology.
in: WEISMANN, G. (edit.): Cell biology of inflammation.
Elsevier, North Holland, New York, pp. 469-496.

ENBERGS, H. (1975): Die Feinstruktur der Leukozyten des Hausgeflügels.
Fortschritte der Veterinärmedizin 22, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 76-82.

EPSTEIN, L.B. (1976): The ability of macrophages to augment in vitro mitogen- and antigen-stimulated production of interferon and other mediators of cellular immunity by lymphocytes.
in: NELSON, D.S. (edit.): Immunobiology of the macrophage. Academic Press, New York, San Francisco, pp. 201-234.

EPSTEIN, L.B. (1977): Mitogen and antigen induction of interferon in vitro and in vivo.
Tex. Rep. Biol. Med. 35, 42-46.

EPSTEIN, L.B. (1979): The comparative biology of immune and classical interferons.
in: COHEN, S., PICK, E. and OPPENHEIM, J.J. (edit.): Biology of the lymphokines.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 443-458.

EPSTEIN, L.B. and CLINE, M.J. (1974): Chronic lymphocytic leukaemia. Studies on mitogen-stimulated lymphocyte interferon as a new technique for assessing T-lymphocyte effector function.
Clin. Exp. Immunol. 16, 553-558.

EPSTEIN, L.B., CLINE, M.J. and MERIGAN, T.C. (1971): The interaction of human macrophages and lymphocytes in the phytohemagglutinin-stimulated production of interferon.
J. Clin. Invest. 50, 744-753.

EPSTEIN, L.B., KRETH, H.W. and HERZENBERG, L.A. (1974): Fluorescence-activated cell sorting of human T and B-lymphocytes. II. Identification of the cell type responsible for interferon production and cell proliferation in response to mitogens.
Cell. Immunol. 12, 407-421.

EPSTEIN, L.B. and SALMON, S.E. (1974): The production of interferon by malignant plasma cells from patients with multiple myeloma.
J. Immunol. 112, 1131-1138.

EVANS, R. and ALEXANDER, P. (1976): Mechanism of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages.
in: NELSON, D.S. (edit.): Immunobiology of the macrophage. Academic Press, New York, San Francisco, pp. 535-576.

EVANS, G. and IVANYI, J. (1975): Antibody synthesis by chicken spleen cells in vitro. I. Requirements of B-cells at various stages after immunization for T-cells, macrophages and antigen.
Eur. J. Immunol. 5, 747-752.

EWERT, D.L. and COOPER, M.D. (1978): Ia-like antigens in the chicken: serologic characterization and ontogeny of cellular expression.
Immunogenetics 7, 521-524.

EZEKOWITZ, R.A.B. and GORDON, S. (1982): Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in Bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages.
J. Exp. Med. 155, 1623-1637.

EZEKOWITZ, R.A.B., SIM, R.B., HILL, M. and GORDON, S. (1983): Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan.
J. Exp. Med. 159, 244-260.

FALCOFF, R.J. (1972): Some properties of virus and immune-induced human lymphocyte interferons.
J. Gen. Virol. 16, 251-253.

FALK, W. and MÄNNEL, D.N. (1983): Induction of T cell cytotoxicity is regulated by a minimum of 3 different lymphokines.
in: OPPENHEIM, J.J. and COHEN, S. (edit.): Interleukins, lymphokines and cytokines.
Academic Press, New York, London, pp. 109-112.

FARRAR, J.J., BENJAMIN, W.R., HILFIKER, M.L., HOWARD, M., FARRAR, W.L. and FULLER-FARRAR, J. (1982):
The biochemistry, biology and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody forming B cell responses.
Immunol. Rev. 63, 129-166.

FIDLER, I.J. (1974): Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages.
Cancer Res. 34, 1074-1078.

FIDLER, I.J. (1980): Therapy of spontaneous metastases by intravenous injection of liposomes containing lymphokines.
Science 208, 1469-1471.

FIDLER, I.J., ROBLIN, R.O. and POSTE, G. (1978): In vitro tumoricidal activity of macrophages against virus-transformed lines with temperature-dependent transformed phenotypic characteristics.
Cell. Immunol. 38, 131-146.

FINLEY, G.J., BOOTH, R.J. and MARBROOK, J. (1977):
Interferon-induced antibody suppression: a selective effect on high density, late responding precursor cells.
Eur. J. Immunol. 7, 123-126.

FINTER, N.B. (1969): Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays.
J. Gen. Virol. 5, 419-427.

FIRTH, G.A. (1977): The normal lymphatic system of the domestic fowl.
Vet. Bull. 47, 167-179.

FISCHER, D.G. and RUBINSTEIN, M. (1983): Spontaneous production of interferon-γ and acid-labile interferon-α by subpopulations of human mononuclear cells.
Cell. Immunol. 81, 426-434.

FITCH, F.W., PRYSTOWSKY, M.B., ELY, J.M., WILDE, D., QUINTANS, J., GOLDWASSER, E., GOLDMAN, J., GOLDMAN, M., BELLER, D.I., REMOLD, H., IHLE, J.N. and VOGEL, S.N. (1983): Multiple lymphokine activities are secreted by a cloned murine T helper cell.
in: OPPENHEIM, J.J. and COHEN, S. (edit.): Interleukins, lymphokines, and cytokines.
Academic Press, New York, London, pp. 643-648.

FOWLES, R.E., FAJARDO, I.M., LEIBOVITCH, J.L. and DAVID, J.R. (1973): The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes.
J. Exp. Med. 138, 952-964.

FOX, J. and SOLOMON, B. (1981): Chicken non-lymphoid leukocytes.
in: ROSE, M.E., PAYNE, L.N. and FREEMAN, B.M. (edit.): Avian immunology.
British Poultry Science Limited, Clark Constable Limited, Edinburgh, pp. 135-165.

FREEDMAN, V.H., CALVELLI, T.A., SILAGI, S. and SILVERSTEIN, S.C. (1980): Macrophages elicited with heat-killed Bacillus Calmette-Guerin protect C57 Bl/6J mice against a syngeneic melanoma.
J. Exp. Med. 152, 657-673.

FRESHMAN, M.M., MERIGAN, T.C., REMINGTON, J.S. and BROWNLEE, I.E. (1966): In vitro and in vivo antiviral action of an interferon-like substance induced by Toxoplasma gondii.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 862-866.

FREUND, M. and PICK, E. (1985): The mechanism of action of lymphokines. VIII. Lymphokine-enhanced spontaneous hydrogen peroxide production by macrophages.
Immunology 54, 35-45.

FRIEDMAN, R.M. (1979): Interferons: interactions with cell surfaces.
in: GRESSER, I. (edit.): Interferon,Volume 1.
Academic Press, New York, London, pp. 53-74.

FRIEDMAN, R.M. and COOPER, H.L. (1967): Stimulation of interferon production in human lymphocytes by mitogens.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 901-905.

FURTH, R.VAN (1970): Mononuclear phagocytes.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburgh.

FURTH, R.VAN (1980): Cells of the mononuclear phagocytic system. Nomenclature in terms of sites and conditions.
in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes: functional aspects.
Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, pp. 1-30.

FURTH, R.VAN, COHN, Z.A., HIRSCH, J.G., HUMPHREY, J.H., SPECTOR, W.G. and LANGEVOORT, H.L. (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells.
Bull. WHO 46, 845-852.

FURTH, R.VAN, COHN, Z.A., HIRSCH, J.G., HUMPHREY, J.H., SPECTOR, W.G. and LANGEVOORT, H.L. (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells.
Bull. WHO 46, 845-852.

FURTH, R.VAN, DIESSELHOFF-DEN DULK, M.M.C. and MATTIE, H. (1973): Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction.
J. Exp. Med. 138, 1314-1330.

FURTH, R.VAN and WILLEMZE, R. (1979): Phagocytic cells during an acute inflammatory reaction.
in: GRUNDMANN, E. and KIRSTEN, W.H. (edit.): Current topics in pathology, Volume 68.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 179-212.

GATENBY, P.A., KOTZIN, B.L. and ENGLEMAN, E.G. (1981): Induction of immunglobulin secreting cells in the human autologous mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets defined with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 127, 2130-2135.

GEMSA, D., KOZAN, B., LOVETT, D., KUBELKA, C. and KRAMMER, P.H. (1984): Activation of macrophages to tumor cytotoxicity by the combined action of two lymphokines: interferon γ (IFN γ) and macrophage cytotoxicity inducing factor (MCIF).
Immunobiology 167, 239.

GILBERT, K.M. and HOFFMANN, M.K. (1982): Lymphokine-induced suppressor B cells.
Immunology 46, 545-553.

GILLILAND, T., KLESIUS, P.H. and GIAMBRONE, J. (1982): Inhibition of chicken leukocyte migration in vitro: a direct agarose plate assay.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 5, 457-468.

GILLIS, S., MOCHIZUKI, D.Y., CONLON, P.J., HEFENEIDER, S.H., RAMTHUN, C.A., GILLIS, A.E., FRANK, M.B., HENNEY, C.S. and WATSON, J.D. (1982): Molecular characterization of interleukin 2.
Immunol. Rev. 63, 167-209.

GISLER, R.H., LINDAHL, P. and GRESSER, I. (1974): Effects of interferon on antibody synthesis in vitro. J. Immunol. 113, 438-444.

GLASER, M. (1980): Indomethacin-sensitive suppressor cells regulate the cell-mediated cytotoxic response to SV 40-induced tumor-associated antigens in mice. Eur. J. Immunol. 10, 489-495.

GLASS, E.J., STEWART, J. and WEIR, D.M. (1981): Presence of bacterial binding 'lectin-like' receptors on phagocytes. Immunology 44, 529-534.

GLEDHILL, A.W. (1959): The effect of bacterial endotoxin on resistance of mice to ectromelia. Br. J. Exp. Pathol. 40, 195-205.

GLICK, B., CHANG, T.S. and JAAP, R.G. (1956): The bursa of Fabricius and antibody production. Poult. Sci. 35, 224-225.

GLICK, B., SATO, K. and COHENOUR, F. (1964): Comparison of the phagocytic ability of normal and bursectomized birds. J. Reticuloendothel. Soc. 1, 442-449.

GOLDYNE, M.E. and STOBO, J.D. (1981): Immunoregulatory role of prostaglandins and related lipids. Crit. Rev. Immunol. 2, 189-223.

GREAVES, M.F. and BAUMINGER, S. (1972): Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens. Nature New Biol. 235, 67-70.

GRECCHI, R., SALIBA, A.M. and MARIANO, M. (1980): Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. J. Pathol. 130, 23-31.

GRESSER, I., BROUTY-BOYE,D., THOMAS, M.G. and MACIEIRA-COELHO,A. (1970): Interferon and cell division. I. Inhibition of the multiplication of mouse leukemia L1210 cells in vitro by interferon preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 1052-1058.

GRESSER, I., MOREL-MAROGER, L., RIVIERE, Y., GUILLON, J.C., TOVEY, M.G., WOODROW, D., SLOPER, J.C. and MOSS, J. (1980): Interferon-induced disease in mice and rats. Ann. N.Y. Acad. Sci. 350, 12-20.

GRESSER, I., TOVEY, M.G., MAURY, C. and CHOUROULINKOV, J. (1975): Lethality of interferon preparations for newborn mice. Nature 258, 76-78.

GREY, H.M., COLON, S.M. and CHESNUT, R.W. (1982): Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting B cells. II. Biochemical comparison of the fate of antigen in B cell tumors and macrophages. J. Immunol. 129, 2389-2395.

GRIFFIN, F.M.JR., BIANCO, C. and SILVERSTEIN, S.C. (1975): Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. J. Exp. Med. 141, 1269-1277.

GRISWOLD, D.E., BADGER, A.M., BENDER, P.E., SITRIN, R.D., ANTELL, L., GREIG, R.G. and POSTE, G. (1983): Differential effects of intact subunits and nicked fragments of Concanavalin A on immune functions in vitro and in vivo. J. Immunol. 131, 1626-1628.

GROENEWEGEN, G. and BUURMAN, W.A. (1984): Endothelial cells as accessory cells for allo-antigens. Immunobiology 167, 154-155.

HAMANN, U. and KRAMMER, P.H. (1983): Segregation of macrophage activating factor (MAF) and immune interferon (IFN-γ) activities in supernatants (SN) of induced T cell clones in limiting dilution (LD) microcultures. Immunobiology 165, 270.

HAMANN, U. and KRAMMER, P.H. (1984): Activation of macrophage (MΘ) tumor cytotoxicity by the synergism of two cell derived lymphokines: immune interferon (IFN-γ) and MΘ cytotoxicity inducing factor 2 (MCIF 2). Immunobiology 167, 239-240.

HAMILTON, T.A., FISHMAN, M., CRAWFORD, G. and LOOK, T. (1982): Sensitivity to macrophage-mediated cytostasis is cell cycle dependent. Cell. Immunol. 69, 363-373.

HARTUNG, H.P. and HADDING, U. (1983): Synthesis of complement by macrophages and modulation of their functions through complement activation. Springer Semin. Immunopathol. 6, 283-326.

HENIS, Y.I. (1984): Mobility modulation by local Concanavalin A binding. J. Biol. Chem. 259, 1515-1519.

HERBERMAN, R.B., ORTALDO, J.R., MANTOVANI, A., HOBBS, D.S., KUNG, H.-F. and PESTKA, S. (1982): Effect of human recombinant interferon on cytotoxic activity of natural killer (NK) cells and monocytes. Cell. Immunol. 67, 160-167.

HERON, I., BERG, K. and CANTELL, K. (1976): Regulatory effect of interferon on T cells in vitro.
J. Immunol. 117, 1370-1373.

HERSH, E.M. and HARRIS, J.E. (1968): Macrophage-lymphocyte interaction in the antigen-induced blastogenic response of human peripheral blood leukocytes.
J. Immunol. 100, 1184-1194.

HEUSER, C.H., ANDERSON, C.L. and GREY, H.M. (1977): Receptors for Ig G: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and a definition of two distinct receptors on a mouse cell line.
J. Exp. Med. 145, 1316-1327.

HIRATA, F., TOYOSHIMA, S., AXELROD, J. and WAXDAL, M.J. (1980): Phospholipid methylation: a biochemical signal modulating lymphocyte mitogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 862-865.

HIRSCH, M.S., ELLIS, D.A., BLACK, P.H., MONACO, A.P. and WOOD, M.L. (1974): Immunosuppressive effects of an interferon preparation in vivo.
Transplantation 17, 234-236.

HOVI, T., SUNI, J., HORTLING, L. and VAHERI, A. (1978): Stimulation of chicken lymphocytes by T- and B-cell mitogens.
Cell. Immunol. 39, 70-78.

HOWARD, M.C. (1982): Antigen-induced B lymphocyte differentiation.
Crit. Rev. Immunol. 3, 181-208.

HUANG, K.Y., SCHULTZ, W.W. and GORDON, F.B. (1968): Interferon induced by Plasmodium berghei.
Science 162, 123-125.

HÜBNER, L., KNIEP, E.M., LAUKEL, H., SORG, C., FISCHER, H., GASSEL, W.D., HAVEMANN, K., KICKHÖFEN, B., LOHMANN-MATTHES, M.-L., SCHIMPL, A. and WECKER, E. (1980): Chemical characterization of macrophage cytotoxicity factor, macrophage migration inhibitory factor, T-helper cell-replacing factor and colony-stimulating factor from culture supernatants of concanavalin A-stimulated murine spleen cells.
Immunobiology 157, 169-178.

ISAACS, A. and LINDENMANN, J. (1957): Virus interference I. The interferon.
Proc. Roy. Soc. B. 147, 258-267.

ISAACS, A., LINDENMANN, J. and VALENTINE, R.C. (1957): Virus interference. II. Some properties of interferon.
Proc. Roy. Soc. B. 147, 268-273.

ISSEKUTZ, T., CHU, E. and GEHA, R.S. (1982): Antigen presentation by human B cells: T cell proliferation induced by Epstein Barr virus B lymphoblastoid cells.
J. Immunol. 129, 1446-1450.

JOHNSON, H.M., BLALOCK, J.E. and BARON, S. (1977): Separation of mitogen-induced suppressor and helper cell activities during inhibition of interferon production by cyclic AMP.
Cell. Immunol. 33, 170-179.

JOHNSON, H.M., SMITH, B.G. and BARON, S. (1975): Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations.
J. Immunol. 114, 403-409.

JULIUS, M.H., SIMPSON, E. and HERZENBERG, L.A. (1973): A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645-649.

KALTENBACH, J.P., KALTENBACH, M.H. and LYONS, W.B. (1958): Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells.
Exp. Cell Res. 15, 112-117.

KALTMANN, B., GEMSA, D., HÜLTNER, L., KEES, U., KUBELKA, C. and KRAMMER, P.H. (1983): Segregation of immune interferon (IFN-γ), macrophage activating factors (MAFs), and colony stimulating factors (CSFs) in concanavalin A induced supernatants (SN) of T cell hybridomas.
Immunobiology 165, 289.

KARNOVSKY, M.L. and LAZDINS, J.K. (1978): Biochemical criteria for activated macrophages.
J. Immunol. 121, 809-813.

KATO, N., NAKASHIMA, I. and OHTA, F. (1975): Interferon production in mice by the capsular polysaccharide of Klebsiella pneumonia.
Infect. Immun. 12, 1-9.

KATZ, D.H. and BENACERRAF, B. (1972): The regulatory influence of activated T cells on B cell responses to antigen.
Adv. Immunol. 15, 1-94.

KE, Y.H. and HO, M. (1967): Characterization of virus and endotoxin-induced interferons obtained from the serum and urine of rabbits.
J. Virol. 1, 883-890.

KELLER, R. (1974): Modulation of cell proliferation by macrophages: a possible function apart from cytotoxic tumour rejection.
Br. J. Cancer 30, 401-415.

KELLER, R. (1975): Major changes in lymphocyte proliferation evoked by activated macrophages.
Cell. Immunol. 17, 542-551.

KELLER, R. (1976a): Susceptibility of normal and transformed cell lines to cytostatic and cytocidal effects exerted by macrophages.
J. Natl. Cancer Inst. 56, 369-374.

KELLER, R. (1976b): Cytostatic and cytocidal effects of activated macrophages.
in: NELSON, D.S. (edit.): Immunobiology of the macrophage.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 487-508.

KELLER, R. (1976c): Cytostatic and cytocidal effects of activated nonimmune macrophages.
in: FINK, M.A. (edit.): The macrophage in neoplasia.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 149-164.

KELLER, R. (1981): Immunologie und Immunpathologie.
Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

KELLER, R.H. and CALVANICO, N.J. (1984): Suppressor macromolecules.
Crit. Rev. Immunol. 5, 149-199.

KIMBALL, P.C. and DUESBERG, P.H. (1971): Virus interference by cellular double-stranded ribonucleic acid.
J. Virol. 7, 697-706.

KINDT, T.J. and ROBINSON, M.A. (1984): Major histocompatibility complex antigens.
in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology.
Raven Press, New York, pp. 347-377.

KIRCHNER, H., MUCHMORE, A.V., CHUSED, T.M., HOLDEN, H.T. and HERBERMAN, R.B. (1975): Inhibition of proliferation of lymphoma cells and T lymphocytes by suppressor cells from spleens of tumor-bearing mice.
J. Immunol. 114, 206-210.

KIRCHNER, H. and OPPENHEIM, J.J. (1972): Stimulation of chicken lymphocytes in a serum-free medium.
Cell. Immunol. 3, 695-699.

KLASEN, A. (1983): Untersuchungen über die Kultivierung von Hühner-Blutmonozyten und über Eigenschaften der in vitro ausgereiften unvorbehandelten oder aktivierten Makrophagen.
Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

KLEIN, J. (1982): Immunology, the science of self-nonself discrimination.
A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, pp. 3-19.

KLEMM, C. (1983): Gewinnung von Peritonealexsudatzellen des Huhnes unter besonderer Berücksichtigung des Anteils adhärenter Zellen nach Stimulierung mit Proteose-Pepton. Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

KLESIUS, P.H. (1982): Intercellular communication: role of soluble factors in cellular immune responses. J. Am. Vet. Med. Ass. 181, 1015-1021.

KLIMETZEK, V. and SORG, C. (1977): Lymphokine-induced secretion of plasminogen activator by murine macrophages. Eur. J. Immunol. 7, 185-187.

KLINE, K. and SANDERS, B.G. (1980): Developmental profile of chicken splenic lymphocyte responsiveness to ConA and PHA and studies on chicken splenic and bone marrow cells capable of inhibiting mitogen-stimulated blastogenic responses of adult splenic lymphocytes. J. Immunol. 125, 1792-1797.

KNIEP, E.M., DOMZIG, W., LOHMANN-MATTHES, M.-L. and KICKHÖFEN, B. (1981): Partial purification of macrophage cytotoxicity factor (MCF, MAF) and its separation from migration inhibition factor (MIF). J. Immunol. 127, 417-422.

KOHASE, M., SAITO, S., IIZUKA, E., MATSUMURA, H. and KOHNO, S. (1983): Interferon production associated with the ageing of primary chick embryo cells is not caused by priming. J. Gen. Virol. 64, 2017-2020.

KRISTENSEN, F., KRISTENSEN, B. and LAZARY, S. (1982): The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. Vet. Immunol. Immunopathol. 3, 203-277.

KRISTENSEN, F., KRISTENSEN, B., VANDEVELDE, M., HIGGINS, R.J. and DE WECK, A.L. (1981): Analysis of the in vitro activation and proliferation process in lymphocytes deriving from canine thymus and mesenteric lymphnode. Vet. Immunol Immunopathol. 2, 579-590.

KURLAND, J.I. and BOCKMAN, R. (1978): Prostaglandin E production by human monocytes and mouse macrophages. J. Exp. Med. 147, 952-957.

KURLAND, J.I., BROXMEYER, H.E., PELUS, L.M., BOCKMAN, R.S. and MOORE, M.A.S. (1978): Role for monocyte-macrophage-derived colony-stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. Blood 52, 388-407.

LAMONT, S.J. and ALTEN, P.J.VAN (1981): Characteristics of nylon fiber adherence-separated chicken splenocytes. J. Immunol. Meth. 40, 181-191.

LANGFORD, M.L., STANTON, G.J. and JOHNSON, H.M. (1978): Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human peripheral lymphocytes. Infect. Immun. 22, 62-68.

LANGFORD, M.P., GEORGIADES, J.A., STANTON, G.J., DIANZANI, F. and JOHNSON, H.M. (1979): Large-scale production and physiochemical characterization of human immune interferon. Infect. Immun. 26, 36-41.

LEE, L.F. (1974): In vitro assay of mitogen stimulation of avian peripheral lymphocytes. Avian Dis. 18, 602-609.

LEE, L.F. (1984): Proliferative response of chicken T- and B-lymphocytes to mitogens. in: KENDE, M., GAINER, J. and CHIRIGOS, M. (edit.): Chemical regulation of immunity in veterinary medicine. Alan R. Liss., Inc., New York, pp. 41-52.

LEE, L.F., SHARMA, J.M., NAZERIAN, K. and WITTER, R.L. (1978): Suppression of mitogen-induced proliferation of normal spleen cells by macrophages from chickens inoculated with Marek's disease virus. J. Immunol. 120, 1554-1559.

LEIBOVICH, S.J. and ROSS, R. (1976): A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. Am. J. Pathol. 84, 501-513.

LINDAHL, P., LEARY, P. and GRESSER, I. (1972): Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 721-725.

LINDAHL-MAGNUSSON, P., LEARY, P. and GRESSER, I. (1971): Interferon and cell division. VI. Inhibitory effect of interferon on the multiplication of mouse embryo and mouse kidney cells in primary cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 1044-1050.

LINDAHL-MAGNUSSON, P., LEARY, P. and GRESSER, I. (1972): Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin or by allogenic cells. Nature New Biology 237, 120-121.

LINDENMANN, J. and GIFFORD, G.E. (1963): Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon. III. A simplified plaque inhibition assay of interferon. Virology 19, 302-309.

LING, N.R. and KAY, J.E. (1975): Lymphocyte stimulation. North Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.

LIS, H. and SHARON, N. (1977): Lectins: their chemistry and application to immunology.
in: SELA, M. (edit.): The antigens.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 429-529.

LITTMAN, B.H. and RUDDY, S. (1977): Production of the second component of complement by human monocytes: stimulation by antigen-activated lymphocytes or lymphokines.
J. Exp. Med. 145, 1344-1352.

LOHMANN-MATTHES, M.-L. (1983): Relationship between MAF and interferon.
Immunobiology 165, 312.

LONDEI, M., LAMB, J.R., BOTTAZZO, G.F. and FELDMAN, M. (1984): Thyroid epithelial cells can present antigen.
Immunobiology 167, 46.

LUKAS, B. and HRUSKOVA, J. (1968): In vivo induction of an interferon-like inhibitor by kanamycin.
Acta Virol. 12, 263-266.

MACKANESS, G.B. (1970): Cellular immunity.
in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 461-477.

MÄNNEL, D.N. and FALK, W. (1983): Requirement of γ-interferon in activation of macrophages for tumor cytotoxicity.
in: OPPENHEIM, J.J. and COHEN, S. (edit.): Interleukins, lymphokines, and cytokines.
Academic Press, New York, London, pp. 287-290.

MAHESWARAN, S.K. and THIES, E.S. (1975): Development of a microculture system for stimulation of chicken peripheral blood lymphocytes with concanavalin A.
Am. J. Vet. Res. 36, 1053-1055.

MAKINODAN, T. and KAY, M.M.B. (1980): Age influence on the immune system.
Adv. Immunol. 29, 287-330.

MANTOVANI, B. (1981): Phagocytosis of immune complexes mediated by Ig M and C3 receptors by macrophages from mice treated with glycogen.
J. Immunol. 126, 127-130.

MANTOVANI, B., RABINOVITCH, M. and NUSSENZWEIG, V. (1972): Phagocytosis of immune complexes by macrophages: different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunglobulin (Ig G).
J. Exp. Med. 135, 780-792.

MARCUCCI, F., KLEIN, B., ALTEVOGT, P., LANDOLFO, S. and KIRCHNER, H. (1984): Concanavalin A-induced interferon gamma production by murine spleen cells and T cell lines. Lack of correlation with Lyt 1,2 phenotype. Immunobiology 166, 219-227.

MARTIN, D.E. and GLICK, B. (1983): Physiochemical characterization of lymphocyte inhibitory factor (LyIF) isolated from avian B and T cells. Cell. Immunol. 79, 383-388.

MC NEILL, T.A. and FLEMING, W.A. (1971): The relationship between serum interferon and an inhibitor of mouse haemopoietic colonies in vitro. Immunology 21, 761-766.

MC NEILL, T.A., FLEMING, W.A. and MC CANCE, D.J. (1972): Interferon and haemopoietic colony inhibitor responses to poly I-poly C in rabbits and hamsters. Immunology 22, 711-721.

MEADE, C.J., LACHMANN, P.J. and BRENNER, S. (1974): A sensitive assay for cellular hypersensitivity based on the uptake of radioactive colloidal gold. Immunology 27, 227-239.

MELTZER, M.S., TUCKER, R.W., SANFORD, K.K. and LEONARD, E.J. (1975): Interaction of BCG-activated macrophages with neoplastic and nonneoplastic cell lines in vitro: quantitation of the cytotoxic reaction by release of tritiated thymidine from prelabeled target cells. J. Natl. Cancer Inst. 54, 1177-1184.

METCHNIKOFF, E. (1892): Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Masson et Cie, Paris.

METZGER, Z., HOFFELD, J.T. and OPPENHEIM, J.J. (1980): Macrophage-mediated suppression. I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. J. Immunol. 124, 983-988.

MICHL, I., UNKELESS, J.K. and SILVERSTEIN, S.C. (1980): Modulation of macrophage plasma membrane receptors of Ig G and complement. in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes: functional aspects. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, pp. 921-937.

MIGGIANO, V., NORTH, M., BUDER, A. and PINK, J.R.L. (1976): Genetic control of the response of chicken leukocytes to a T-cell mitogen. Nature 263, 61-63.

MOCHIZUKI, M., ZIGLER, J.S.JR., RUSSEL, P. and GERY, I. (1984): Cytostatic and cytolytic activities of macrophages. Regulation by prostaglandins. Cell. Immunol. 83, 34-42.

MOORE, M.A.S. and OWEN, J.J.T. (1967): Experimental studies on the development of the thymus. J. Exp. Med. 126, 715-725.

MORIMOTO, C., REINHERZ, E.L. and SCHLOSSMAN, S.F. (1981): Regulation of in vitro primary anti-DNP antibody production by functional subsets of T lymphocytes in man. J. Immunol. 127, 69-73.

MORLAND, B. and KAPLAN, G. (1977): Macrophage activation in vivo and in vitro. Exp. Cell Res. 108, 279-284.

MORRIS, A.G., MORSER, J. and MEAGER, A. (1982): Spontaneous production of gamma interferon and induced production of beta interferon by human T-lymphoblastoid cell lines. Infect. Immun. 35, 533-536.

MORSE, J.H. (1968): Immunological studies of phytohaemagglutinin. I. Reaction between phytohaemagglutinin and normal sera. Immunology 14, 713-726.

NADLER, P.I., KLINGENSTEIN, R.J. and HODES, R.J. (1980): Ontogeny of murine accessory cells: Ia antigen expression and accessory cell function in in vitro primary antibody responses. J. Immunol. 125, 914-920.

NATHAN, C.F., KARNOVSKY, M.L. and DAVID, J.R. (1971): Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. J. Exp. Med. 133, 1356-1376.

NATHAN, C.F., PRENDERGAST, T.J., WIEBE, M.E., STANLEY, E.R., PLATZER, E., REMOLD, H.G., WELTE, K., RUBIN, B.Y. and MURRAY, H.W. (1984): Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-γ. J. Exp. Med. 160, 600-605.

NEUMANN, C. and SORG, C. (1977): Immune interferon. I. Production by lymphokine-activated murine macrophages. Eur. J. Immunol. 7, 719-725.

NEUMANN, C. and SORG, C. (1978): Immune interferon. II. Different cellular sites for the production of murine macrophage migration inhibitory factor and interferon. Eur. J. Immunol. 8, 582-589.

NORTH, R.J. (1978): The concept of the activated macrophage. J. Immunol. 121, 806-809.

OATES, C.M., BISSENDEN, J.F., MAINI, R.N., PAYNE, L.N. and DUMONDE, D.C. (1972): Thymus and bursa dependence of lymphocyte mitogenic factor in the chicken.
Nature New Biology 239, 137-139.

ÖGMUNDSDOTTIR, H.M. and WEIR, D.M. (1976): The characteristics of binding of Corynebacterium parvum to glass-adherent mouse peritoneal exudate cells.
Clin. Exp. Immunol. 26, 334-339.

ÖGMUNDSDOTTIR, H.M. and WEIR, D.M. (1980): Mechanism of macrophage activation.
Clin. Exp. Immunol. 40, 223-234.

OLIVER, P.D. and LE DOUARIN, N.M. (1984): Avian thymic accessory cells.
J. Immunol. 132, 1748-1755.

OLSTAD, R., DEGRE, M. and SELJELID, R. (1981)::
Production of immune interferon (type II) in cocultures of mouse peritoneal macrophages and syngeneic tumour cells.
Scand. J. Immunol. 13, 605-608.

OPPENHEIM, J.J. and COHEN, S. (1983): Interleukins, lymphokines, and cytokines.
Academic Press, New York, London.

OPPENHEIM, JJ. and ROSENSTREICH, D.L. (1976): Mitogens in immunobiology.
Academic Press, New York, London.

OPPENHEIM, J.J. and SEEGER, R.C. (1976): The role of macrophages in the induction of cell-mediated immunity in vivo.
in: NELSON, D.S. (edit.): Immunobiology of the macrophage.
Academic Press, New York, London, pp. 111-130.

OROPEZA-RENDON, R.L., SPETH, V., HILLER, G., WEBER, K. and FISCHER, H. (1979): Prostaglandin E1 reversibly induces morphological changes in macrophages and inhibits phagocytosis.
Exp. Cell Res. 119, 365-371.

PACE, J.L., RUSSEL, S.W., SCHREIBER, R.D., ALTMAN, A. and KATZ, D.H. (1983a): Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-γ.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3782-3786.

PACE, J.L., RUSSEL, S.W., TORRES, B.A., JOHNSON, H.M. and GRAY, P.W. (1983b): Recombinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing.
J. Immunol. 130, 2011-2013.

PALADE, G.E. (1956): The endoplasmatic reticulum.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, Suppl., 85-98.

PALLADINO, M.A. and THORBECKE, G.J. (1978): Immunity to transplantable carcinogen-induced fibrosarcomas in B2/B2 chickens. II. Macrophage-dependency of adoptive T-cell mediated immunity.
Cell. Immunol. 38, 350-364.

PANTALONE, R. and PAGE, R.C. (1977):
Enzyme production and secretion by lymphokine-activated macrophages.
J. Reticuloendothel. Soc. 21, 343-357.

PAPERMASTER, V., TORRES, B.A. and JOHNSON, H.M. (1983):
Evidence for suppressor T-cell regulation of human gamma interferon production.
Cell. Immunol. 79, 279-287.

PATTERSON, R.J. and YOUMANS, G.P. (1970): Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis.
Infect. Immun. 1, 600-603.

PAUL, W.E. (1984): Immune response genes.
in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology.
Raven Press, New York, 439-455.

PECK, R., MURTHY, K.K. and VAINIO, O. (1982): Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs.
J. Immunol. 129, 4-5.

PELUS, L.M., BROXMEYER, H.E., KURLAND, J.I. and MOORE, M.A.S. (1979): Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. Specifities of prostaglandin E and lactoferrin.
J. Exp. Med. 150, 277-292.

PICK, E., COHEN, S. and OPPENHEIM, J.J. (1979): The lymphokine concept.
in: COHEN, S., PICK, E. and OPPENHEIM, J.J. (edit.): Biology of the lymphokines.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 1-12.

PICK, E. and TURK, J.L. (1972): The biological activities of soluble lymphocyte products.
Clin. Exp. Immunol. 10, 1-12.

PIESSENS, W.F., CHURCHILL, W.H. and DAVID, J.R. (1975):
Macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators kill neoplastic but not normal cells.
J. Immunol. 114, 293-299.

PINK, J.R.L., DROEGE, W., HALA, K., MIGGIANO, V.C. and ZIEGLER, A. (1977): A three-locus model for the chicken major histocompatibility complex.
Immunogenetics 5, 203-206.

PINK, J.R.L. and VAINIO, O. (1983): Genetic control of the response of chicken T-lymphocytes to concanavalin A: cellular localization of the low responder defect. Eur. J. Immunol. 13, 571-575.

POLVERINI, P.J., COTRAN, R.S., GIMBRONE, M.A.JR. and UNANUE, E.R. (1977): Activated macrophages induce vascular proliferation. Nature 269, 804-806.

POSTLETHWAITE, A.E., SMITH, G.N., MAINARDI, C.L., SEYER, J.M. and KANG, A.H. (1984): Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. J. Immunol. 132, 2470-2477.

POTWOROWSKI, E.F. (1972): T and B lymphocytes. Organ and age distribution in the chicken. Immunology 23, 199-204.

QUIE, P.G., YANAI, M., ABRAMSON, J.S. and MILLS, E.L. (1982): Oxidative events associated with microbicidal activity in phagocytic cells. in: KARNOVSKY, M.L. and BOLIS, L. (edit.): Phagocytosis - past and future. Academic Press, New York, London, pp. 463-474.

RABINOVITCH, M. (1967a): The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. Exp. Cell Res. 46, 19-28.

RABINOVITCH, M. (1967b): The role of antibodies in the ingestion of aldehyd-treated erythrocytes attached to macrophages. J. Immunol. 99, 232-237.

RABINOVITCH, M. (1970): Phagocytic recognition. in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 299-315.

RABINOVITCH, M. and DE STEFANO, M.J. (1973a): Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. Exp. Cell Res. 77, 323-334.

RABINOVITCH, M. and DE STEFANO, M.J. (1973b): Macrophage spreading in vitro. II. Manganese and other metals as inducers or as co-factors for induced spreading. Exp. Cell Res. 79, 423-430.

RABINOVITCH, M. and DE STEFANO, M.J. (1973c): Particle recognition by cultivated macrophages. J. Immunol. 110, 695-701.

RABINOVITCH, M. and DE STEFANO, M.J. (1974): Macrophage spreading in vitro. III. The effect of metabolic inhibitors, anesthetics and other drugs on spreading by subtilisin.
Exp. Cell Res. 88, 153-162.

RABINOVITCH, M. and HAMBURG, S.I. (1980): Macrophage activation by interferon or interferon inducers.
in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes: functional aspects.
Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, pp. 1515-1538.

RADWAN, A.I., BUENING, G.M. and LOAN, R.W. (1975): ^{51}Cr release microassay for measuring cell-mediated immunity in chickens.
Infect. Immun. 11, 436-440.

RAFF, M.G., STERNBERG, M. and TAYLOR, R.B. (1970): Immunglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells.
Nature 225, 553-554.

RANGAN, S.R.S. (1967): Origin of the fibroblastic growths in chicken buffy coat macrophage cultures.
Exp. Cell Res. 46, 477-487.

RATLIFF, T.L., MAC DERMOTT, R.P., POEPPING, N.J., OAKLEY, D.M., SHAPIRO, A. and CATALONA, W.J. (1982): Production of gamma interferon by human T and null cells and its regulation by macrophages.
Cell. Immunol. 74, 111-119.

REEM, G.H., COOK, L.A., HENRIKSEN, D.M. and VILCEK, J. (1982): Gamma interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B cell lines.
Infect. Immun. 37, 216-221.

RIES, S., KÄUFER, I. and WEISS, E. (1983): Untersuchungen zur Phagozytosefähigkeit von Hühnerthrombozyten in vitro.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 90, 320-323.

ROCKLIN, R.E., BENDTZEN, K. and GREINEDER, D. (1980): Mediators of immunity: lymphokines and monokines.
Adv. Immunol 29, 55-136.

ROSENSTREICH, D.L. (1981): The macrophage.
in: OPPENHEIM, J.J., ROSENSTREICH, D.L. and POTTER, M. (edit.): Cellular functions in immunity and inflammation.
Elsevier, North Holland, Inc., pp. 127-159.

ROSENTHAL, A.S., BLAKE, J.T., ELLMER, I.J., GREINEDER, D.K. and LIPSKY, P.E. (1976): Macrophage function in antigen recognition by T-lymphocytes.
in: NELSON, D.S. (edit.): Immunobiology of the macrophage.
Academic Press, New York, San Francisco, pp. 131-160.

ROSENTHAL, A.S. and SHEVACH, E.M. (1973): Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes.
J. Exp. Med. 138, 1194-1212.

ROSSI, G. and HIMMELHOCH, S. (1982): Binding sites for -methyl-manno-pyranoside and yeast mannan on chicken bone marrow macrophages.
Immunobiology 162, 411-412.

ROSSI, G. and WEILER, H. (1982): Phagocytosis of untreated candida cells by chicken bone marrow and peritoneal macrophages.
Zentralbl. Bakteriol. Abt. 1, Orig. A 251, 472.

ROSSI, G., WEILER, H. and GRUND, S. (1983): Phagocytic activity of chicken macrophages towards untreated candida cells as influenced by cell interactions.
Proceedings of the VIIIth ISHAM Congress 1982, Massey University, Palmerston North, New Zealand, pp. 240-243.

ROTEM, Z., COX, R.A. and ISAACS, A. (1963): Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid.
Nature 197, 564-566.

ROUBIN, R. and ZOLLA-PAZNER, S. (1979): Markers of macrophage heterogeneity. I. Studies of macrophages from various organs of normal mice.
Eur. J. Immunol. 9, 972-978.

RYTEL, M.W. and JONES, T.C. (1966): Induction of interferon in mice infected with Toxoplasma gondii.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 859-862.

RYTEL, M.W. and MARSDEN, P.D. (1970): Induction of an interferon-like inhibitor by Trypanosoma cruzi in mice.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, 929-932.

SACHS, D.H. (1984): The major histocompatibility complex.
in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology.
Raven Press, New York, pp. 303-346.

SAITO, N., SUZUKI, F., SASAKI, K. and ISHIDA, N. (1976): Antiviral and interferon-inducing activity of a new glutarimide antibiotic, 9-methylstreptimidone.
Antimicrob. Agents Chemother. 10, 14-27.

SALVIN, S.B., YOUNGNER, J.S., NISHIO, J. and NETA, R.J. (1975): Tumor suppression by a lymphokine released into the circulation of mice with delayed hypersensitivity.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 1233-1235.

SANDIN, R.L., ROGERS, A.L., PATTERSON, R.J. and BENEKE, E.S. (1982): Evidence for mannose-mediated adherence of Candida albicans to human buccal cells in vitro. Infect. Immun. 35, 79-85.

SANDRITTER, W. und BENEKE, G. (1974): Allgemeine Pathologie. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, S. 448-487.

SCHAUENSTEIN, K., GLOBERSON, A. and WICK, G. (1982): Avian lymphokines: 1. Thymic cell growth factor in supernatants of mitogen stimulated chicken spleen cells. Devel. Comp. Immunol. 6, 533-540.

SCHAUENSTEIN, K. and HAYARI, Y. (1983): Avian lymphokines. Devel. Comp. Immunol. 7, 767-768.

SCHIMPL, A., HÜBNER, L., WONG, C.A. and WECKER, E. (1980): Distinction between T helper cell replacing factor (TRF) and T cell groth factor (TCGF). Behring Inst. Mitt. 67, 221-225.

SCHMIDT, M.E., DOUGLAS, S.D. and RUBIN, A. (1973): Human monocyte activation by supernatants from concanavalin A (ConA) stimulated lymphocytes. Cell. Immunol. 9, 45-59.

SCHNETZLER, M., OOMMEN, A., NOWAK, J.S. and FRANKLIN, R.M. (1983): Characterization of chicken T cell growth factor. Eur. J. Immunol. 13, 560-566.

SCHULTZ, R.M. and CHIRIGOS, M.A. (1980): Macrophage activation for nonspecific tumor cytotoxicity. Adv. Pharmacol. Chemother. 17, 157-193.

SCHULTZ, R.M. and KLEINSCHMIDT, W.J. (1983): Functional identity between murine γ interferon and macrophage activating factor. Nature 305, 239-240.

SCHWARTZ, R.H. (1984): The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions. in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology. Raven Press, New York, pp. 379-438.

SCOFIELD, V.L. and BOSE, H.R.JR. (1978): Depression of mitogen responses in spleen cells from reticuloendotheliosis virus-infected chickens and their suppressive effect on normal lymphocyte response. J. Immunol. 120, 1321-1325.

SEEGER, R.C. and OPPENHEIM, J.J. (1970): Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen-induced transformation of lymphocytes. J. Exp. Med. 132, 44-65.

SHARMA, J.M. (1980): In vitro suppression of T-cell mitogenic response and tumor cell proliferation by spleen macrophages from normal chickens.
Infect. Immun. 28, 914-922.

SHARMA, J.M. and TIZARD, I. (1984): Avian cellular immune effector mechanisms - a review.
Avian Pathol. 13, 357-376.

SHARON, N. (1984): Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis.
Immunology Today 5, 143-147.

SHEVACH, E.M. (1984): Macrophages and other accessory cells.
in: PAUL, W.E. (edit.): Fundamental immunology.
Raven Press, New York, pp. 71-107.

SHEVACH, E.M. and ROSENTHAL, A.S. (1973): Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response.
J. Exp. Med. 138, 1213-1229.

SILVERSTEIN, S.C. and LOIKE, J.D. (1980): Phagocytosis.
in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes: functional aspects.
Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, pp. 895-917.

SILVERSTEIN, S.C., STEINMAN, R.M. and COHN, Z.A. (1977): Endocytosis.
Annu. Rev. Biochem. 46, 669-722.

SINGER, S.J. (1974): Molecular biology of cellular membranes with application to immunology.
Adv. Immunol. 19, 1-68

SIPKA, S. and SZILAGYI, T. (1984): Trends in the lymphokine research.
Ann. Immunol. Hung. 23, 171-185.

SLUITER, W., HULSING-HESSELINK, E. and FURTH, R.VAN (1982): Synthesis and release of a factor increasing monocytopoiesis (FIM) by macrophages.
in: ROSSI, F. and PATRIARCA, P. (edit.): Biochemistry and function of phagocytes.
Plenum Press, New York, London, pp. 225-232.

SONNENFELD, G., MANDEL, A.D. and MERIGAN, T.C. (1977): The immunsuppressive effect of typ II mouse interferon preparations on antibody production.
Cell. Immunol. 34, 193-206.

SPECTOR, W.G. (1970): The macrophage in inflammation.
Series Haematologica 3, 132-144.

SPECTOR, W.G. and RYAN, G.B. (1970): The mononuclear phagocyte in inflammation.
in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 219-228.

SPICER, S.S., SANNES, P.L., EGUCHI, M. and MC KEEVER, P.E. (1979): Fine structural and cytochemical aspects of the development of macrophages and of their endocytic and secretory activity.
J. Reticuloendothel. Soc. 26, 49-65.

STADECKER, M.J., CALDERON, J., KARNOVSKY, M.L. and UNANUE, E.R. (1977): Synthesis and release of thymidine by macrophages.
J. Immunol. 119, 1738-1743.

STANLEY, E.R. (1981): Colony stimulating factors.
in: HADDEN, J.W., STEWART, W.E. and CLIFTON, N.J. (edit.): The lymphokines.
The Humana Press, New York, pp. 101-132.

STANLEY, E.R. and HEARD, P.M. (1977): Factors regulating macrophage production and growth.
J. Biol. Chem. 252, 4305-4312.

STEINMAN, R.M. and COHN, Z.A. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.
I. Morphology, quantitation, tissue distribution.
J. Exp. Med. 137, 1142-1162.

STEINMAN, R.M. and COHN, Z.A. (1974): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.
II. Functional properties in vitro.
J. Exp. Med. 139, 380-397.

STEINMAN, R.M. and COHN, Z.A. (1975): Dendritic cells, reticular cells and macrophages.
in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 95-107.

STEINMAN, R.M., KAPLAN, G., WITMER, M.D. and COHN, Z.A. (1979): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells. New surface markers and maintenance in vitro.
J. Exp. Med. 149, 1-16.

STEINMAN, R.M., MELLMAN, I.S., MULLER, W.A. and COHN, Z.A. (1983): Endocytosis and the recycling of plasma membrane.
J. Cell Biol. 96, 1-27.

STEINMAN, R.M., SILVER, J.M. and COHN, Z.A. (1978): Fluid phase pinocytosis.
in: Silverstein, S. (edit.): Transport of macromolecules in cellular systems.
Dahlem-Konferenzen, Abakon Verlag Ges., Berlin West, pp. 167-181.

STERZ, J. und WEISS, E. (1973): Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Phagozytose und Vermehrung des Virus der klassischen Geflügelpest (KP) in Thrombozyten infizierter Hühner.
Zbl. Vet. Med. B 20, 613-621.

STERZ, I. und WEISS, E. (1974): Herkunft und Phagozytosefähigkeit der Hühnerthrombozyten.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81, 311-312.

STEWART, W.E. (1979): The interferon system.
Springer Verlag, New York.

STINGL, G., GAZZE-STINGL, L.A., ABERER, W.A. and WOLFF, K. (1981): Antigen presentation by murine epidermal Langerhans cells and its alteration by ultraviolet B light.
J. Immunol. 127, 1707-1713.

STINGL, G., KATZ, S.I., CLEMENT, L., GREEN, I. and SHEVACH, E.M. (1978): Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells.
J. Immunol. 121, 2005-2013.

STINSON, R., MC CORKLE, F. and GLICK, B. (1978): Nylon wool column separation of chicken thymic-derived (T) and bursal-derived (B) lymphocytes.
Poultry Sci. 57, 518-522.

STINSON, R.S., MASHALY, M.M. and GLICK,B. (1979): Thrombocyte migration and the release thrombocyte inhibitory factor (Thr IF) by T and B cells in the chicken.
Immunology 36, 769-774.

STOBO, J., GREEN, I., JACKSON, L. and BARON, S. (1974): Identification of a subpopulation of mouse lymphoid cells required for interferon production after stimulation with mitogens.
J. Immunol. 112, 1589-1593.

STROBER, S. (1972): Recirculation of "B" lymphocytes in immunized rats.
Nature New Biology 237, 247-249.

SUBBA RAO, D.S.V. and GLICK, B. (1977): The production of lymphocyte inhibitory factor (LyIF) by bursal and thymic lymphocytes.
in: BENEDICT, A.A. (edit.): Avian immunology.
Plenum Press, New York, London, pp. 87-98.

SUZUKI, F., SAITO, N. and ISHIDA, N. (1977): Effect of an interferon inducer, 9-methylstreptimidone, on influenza virus infection in mice.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 284, 667-672.

SUZUKI, F., SUGANUMA, T. and ISHIDA, N. (1974):
Interferon induction by an antitumor antibiotic, lymphomycin.
J. Antibiot. 27, 376-378.

TAKEMURA, R. and WERB, Z. (1984): Secretory products of macrophages and their physiological functions.
Am. J. Physiol. 1, C1-C9.

TAYLOR, C. (1961): Attachment and spreading of cells in culture.
Exp. Cell Res., Suppl. , 8, 154-173.

TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. (1980): Effects of interferons on cell growth and function.
in: GRESSER, I. (edit.): Interferon, Volume 2.
Academic Press, New York, London, pp. 13-46.

THIEL, H.-J. and BURKHARDT, E. (1984): Development of optimal conditions for the stimulation of chicken peripheral blood lymphocytes by phytohaemagglutinin (PHA) in the microculture system.
Vet. Immunol. Immunopathol. 6, 327-340.

THOMAS, D.W., YAMASHITA, U. and SHEVACH, E.M. (1977):
Nature of the antigenic complex recognized by T-lymphocytes. IV. Inhibition of antigen-specific T cell proliferation by antibodies to stimulator macrophage Ia antigens.
J. Immunol. 119, 223-226.

TILLES, J.G. and FINLAND, M. (1968): Microassay for human and chick cell interferons.
Appl. Microbiol. 16, 1706-1707.

TIMMS, L. and ALEXANDER, D.J. (1977): Cell-mediated immune response to Newcastle disease vaccines.
Avian Pathol. 6, 51-69.

TIZARD, I.R. (1981): Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie.
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

TODD, I., PUJOL-BORRELL, R., HAMMOND, L., BOTTAZZO, G.F. and FELDMAN, M. (1984): The potential for antigen presentation by endocrine epithelium.
Immunobiology 167, 122.

TOIVANEN, A., TOIVANEN, P., ESKOLA, J. and LASSILA, O. (1981):
Ontogeny of the chicken lymphoid system.
in: ROSE, M.E., PAYNE, L.N. and FREEMAN, B.M. (edit.):
Avian immunology.
British Poultry Science Limited, Clark Constable Limited, Edinburgh, pp. 45-62.

TORRES, B.A., FARRAR, W.L. and JOHNSON, H.M. (1982a):
Interleukin 2 regulates immune interferon (IFN-γ) production by normal and suppressor cell cultures.
J. Immunol. 128, 2217-2219.

TORRES, B.A., YAMAMOTO, J.K. and JOHNSON, H.M. (1982b): Cellular regulation of gamma interferon production. Lyt phenotype of the suppressor cell. Infect. Immun. 35, 770-776.

TOYOSHIMA, S., HIRATA, F., AXELROD, J., BEPPU, M., OSAWA, T. and WAXDAL, M.J. (1982): The relationship between phospholipid methylation and calcium influx in murine lymphocytes stimulated with native and modified ConA. Mol. Immunol. 19, 229-234.

TSUCHIDA, T., FUJIWARA, H., TSUJI, Y. and HAMAOKA, T. (1981): Inhibitory effects of propionibacterium-acnes-activated macrophages on the tumor metastasis enhanced by tumor-specific immunosuppression. Gann 72, 205-212.

TULKENS, P., SCHNEIDER, Y.J. and TROUET, A. (1980): Membrane recycling (shuttle?) in endocytosis. in: FURTH, R.VAN (edit.): Mononuclear phagocytes: functional aspects. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, pp. 613-647.

UDEY, M.C. and Parker, C.W. (1981): Membrane protein synthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes. J. Immunol. 126, 1106-1113.

UNANUE, E.R. (1972): The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Adv. Immunol. 15, 95-165.

UNANUE, E.R. (1981): The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. Adv. Immunol. 31, 1-136.

UNANUE, E.R. and CALDERON, J. (1975): Evaluation of the role of macrophages in immune induction. Fed. Proc. 34, 1737-1742.

UNANUE, E.R., BELLER, D.I., LU, C.Y. and ALLEN, P.M. (1984): Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism. J. Immunol. 132, 1-5.

UNKELESS, J.C. (1977): The presence of two Fc receptors on mouse macrophages; evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. J. Exp. Med. 145, 931-947.

UNKELESS, J.C. and EISEN, H.N. (1975): Binding of monomeric immunoglobulin to Fc receptors of mouse macrophages. J. Exp. Med. 142, 1520-1533.

VAINIO, O. and RATCLIFFE, M.J.H. (1984): Proliferation of chicken peripheral blood leukocytes in response to pokeweed mitogen is macrophage dependent.
Cell. Immunol. 85, 235-243.

VASSALI, J.-D. and REICH, E. (1977): Macrophage plasminogen activator: induction by products of activated lymphoid cells.
J. Exp.Med. 145, 429-437.

VIGNAUX, F. and GRESSER, I. (1977): Differential effects of interferon on the expression of H-2K, H-2D, and Ia antigens on mouse lymphocytes.
J. Immunol. 118, 721-723.

VILCEK, J., BURKE, D., CHANY, C., FRIEDMAN, R., GALASSO, G., GOEDDEL, D., JOKLIK, W., MYERS, M., STEWART, W.E.II, WEISSMAN, C., YOUNGNER, J. and ZOON, K. (1983): Interferon nomenclature.
Cell. Immunol. 80, 432-433.

VILCEK, J., GRESSER, I. and MERIGAN, T.C. (1980): Regulatory functions of interferons.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 350, 1-641.

VOLKMAN, A. (1976): Disparity in origin of mononuclear phagocyte populations.
J. Reticuloendothel. Soc. 19, 249-268.

VOORHIS, W.C.VAN, STEINMAN, R.M., HAIR, L.S., LUBAN, J., WITMER, M.D., KOIDE, S. and COHN, Z.A. (1983): Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. 158, 126-145.

WAARDE, D.VAN, HULSING-HESSELINK, E., SANDKUYL, L.A. and FURTH, R.VAN (1977a): Humoral regulation of monocyto-poiesis during early phase of an inflammatory reaction caused by particulate substances.
Blood 5, 141-154.

WAARDE, D. VAN, HULSING-HESSELINK, E. and FURTH, R.VAN (1977b): Properties of a factor increasing monocyto-poiesis (FIM) occuring in serum during the early phase of an inflammatory reaction.
Blood 50, 727-742.

WAHL, S.M. and WAHL, L.M. (1979): Lymphokine modulation of connective tissue metabolism.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 411-422.

WAHL, S.M., WAHL, L.M. and MC CARTHY, J.B. (1978): Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production.
J. Immunol. 121, 942-946.

WAHL, L.M., WAHL, S.M., MERGENHAGEN, S.E. and MARTIN, G.R. (1975): Collagenase production by lymphokine-activated macrophages.
Science 187, 261-263.

WAKSMAN, B.H. and NAMBA, T. (1976): On soluble mediators of immunologic regulation.
Cell. Immunol. 21, 161-168.

WALLEN, W.C., DEAN, J.H. and LUCAS, D.O. (1973): Interferon and the cellular immune response: separation of interferon-producing cells from DNA-synthetic cells.
Cell. Immunol. 6, 110-114.

WARNER, N.L., SZENBERG, A. and BURNET, F.M. (1962): The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness.
Austral. J. Exptl. Biol. Med. 40, 373-388.

WARR, G.A. (1980): A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 737-741.

WEBER, W.T. (1970): Qualitative and quantitative studies on mixed homologous chicken thymus cell cultures.
Clin. Exp. Immunol. 6, 919-940.

WEEKS, B.A. (1979): Effects of age and nutrition on macrophage function.
J. Reticuloendothel. Soc. 26, 459-462.

WEEKS, B.A., ESCOBAR, M.R., HAMILTON, P.B. and FUESTON, V.M. (1976): Chemotaxis of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by mannan-enriched preparations of Candida albicans.
in: REICHARD, S.M., ESCOBAR, M.R. and FRIEDMAN, H. (edit.): The reticuloendothelial system in health and disease.
Plenum Press, New York, London, pp. 161-169.

WERB, Z., BANDA, M.J. and JONES, P.A. (1980a): Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages.
J. Exp. Med. 152, 1340-1357.

WERB, Z., BAINTON, D.F. and JONES, P.A. (1980b): Degradation of connective tissue matrices by macrophages. III. Morphological and biochemical studies on extracellular, pericellular, and intracellular events in matrix proteolysis by macrophages in culture.
J. Exp. Med. 152, 1537-1553.

WERB, Z. and CHIN, J.R. (1983): Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycollate-elicited macrophages but not by pyran copolymer- or bacillus Calmette Guerin-activated macrophages.
J. Exp. Med. 158, 1272-1293.

WHEELOCK, E.F. (1965): Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin.
Science 149, 310-311.

WIETZERBIN, J., STEFANOS, S., FALCOFF, R., LUCERO, M., CATINOT, L., and FALCOFF, E. (1978): Immune interferon induced by phytohemagglutinin in nude mouse spleen cells.
Infect. Immun. 21, 966-972.

WILKINSON, P.C. (1974): Chemotaxis and inflammation.
Churchill Livingstone, Edinburgh, London.

WILLIAMS, A.F. (1984): The T-lymphocyte antigen receptor - elusive no more.
Nature 308, 108-109.

WIRANOWSKA-STEWART, M. and STEWART, W.E.II. (1981): Determination of human leukocyte populations involved in production of interferons alpha and gamma.
J. Interferon Res. 1, 233-244.

WISSLER, J.H., SORKIN, E. and STECHER, V.J. (1974): Regulation of serum-derived chemotactic activity by the leucotactic binary peptide system.
Antibiot. Chemother. 19, 442-463.

WUSSOW, P.v. , PLATSOUCAS, C.D., WIRANOWSKA-STEWART, M. and STEWART, W.E.II (1981): Human γ interferon production by leukocytes induced with monoclonal antibodies recognizing T cells.
J. Immunol. 127, 1197-1200.

YOFFEY, J.H. (1970): Lymphocyte production in the lympho-myeloid complex.
in: GORDON, A.S.(edit.): The regulation of hematopoiesis, Volume 2.
Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 1421-1454.

YOUNGNER, J.S. and SALVIN, S.B. (1973): Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity.
J. Immunol. 111, 1914-1922.

YOUNGNER, J.S. and STINEBRING, W.R. (1964): Interferon production in chickens infected with Brucella abortus.
Science 144, 1022-1023.

YOUNGNER, J.S., STINEBRING, W.R. and TAUBE, S.G. (1965):
Influence of inhibitors of protein synthesis on interferon formation in mice.
Virology 27, 541-564.

ZINKERNAGEL, R.M., CALLAHAN, G.N., ALTHAGE, A., COOPER, S., KLEIN, P.A. and KLEIN, J. (1978): On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T-cells: evidence for dual recognition.
J. Exp. Med. 147, 882-896.

ZLOTNIK, A., ROBERTS, W.K., VASIL, A., BLUMENTHAL, E., LA ROSA, F., LEIBSON, H.J., ENDRES, R.O., GRAHAM, S.D.JR., WHITE, J., HILL, J., HENSON, P., KLEIN, J.R., BEVAN, M.J., MARRACK, P. and KAPPLER, J.W. (1983):
Coordinate production by a T cell hybridoma of gamma interferon and three other lymphokine activities: multiple activities of a single lymphokine?
J. Immunol. 131, 794-800.

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. V. von Bülow für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. G. Monreal danke ich für sein freundliches Entgegenkommen und seinen jederzeit gewährten Rat.

Frau Dr. G. Rossi gilt mein Dank für die Einführung in die Phagozytoseversuche.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Monika Bertram, Frau Carola Plitz und den anderen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Unterstützung.

LEBENSLAUF

Horst Weiler

9.9.1952	geboren als zweiter Sohn der Eheleute Lieselotte und Alfred Weiler in Duisburg-Hamborn
21.1.1983	Heirat der Tierärztin Sabine Stache
14.3.1985	Eine Tochter

Ausbildung

1958-1962	Besuch der evangelischen Volksschule in Duisburg-Bruckhausen
1962-1971	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Leibniz-Gymnasiums in Duisburg-Hamborn
18.5.1971	Abitur
1971-1973	Studium der Fächer Wirtschaftswissenschaft und Rechtswissenschaft an der Ruhr-Universität Bochum
1973-1976	Studium der Fächer Soziologie und Chemie an der Phillips-Universität Marburg
1976-1982	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
1.2.1982	Approbation als Tierarzt
1981-1983	Mitarbeit an laufenden Forschungsvorhaben im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin
1.6.1983 - 31.3.1985	Wissenschaftlicher Mitarbeiter innerhalb eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschungsprogramms über Hühnermakrophagen bei Herrn Prof. v. Bülow im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen